

GENE RELATING TO DRUG TOLERANCE AND UTILIZATION THEREOF

Publication number: WO0228894 (A1)

Publication date: 2002-04-11

Inventor(s): KOMATANI HIDEYA [JP]; HARA YOSHIKAZU [JP]; KOTANI HIDEHITO [JP]; NAKAGAWA RINAKO [JP]

Applicant(s): BANYU PHARMA CO LTD [JP]; KOMATANI HIDEYA [JP]; HARA YOSHIKAZU [JP]; KOTANI HIDEHITO [JP]; NAKAGAWA RINAKO [JP]

Classification:

- international: A61P35/00; A61P43/00; C07K14/47; C07K14/705; C12N1/15; C12N1/19; C12N1/21; C12P21/08; A61K38/00; A61P35/00; A61P43/00; C07K14/435; C12N1/15; C12N1/19; C12N1/21; C12P21/08; A61K38/00; (IPC1-7): C07K14/47; A61K31/711; A61K45/00; A61P35/00; A61P43/00; C07K16/18; C12N1/15; C12N1/19; C12N1/21; C12N5/10; C12N15/09; C12P21/02; C12P21/08; C12P21/02; C12R1/91; C12N5/10; C12R1/91

- European: C07K14/47; C07K14/705

Application number: WO2001JP08112 20010918

Priority number(s): JP20000303441 20001003

Also published as:

EP1323735 (A1)
US2007141619 (A1)
US2003232362 (A1)
CA2426621 (A1)
AU8806101 (A)

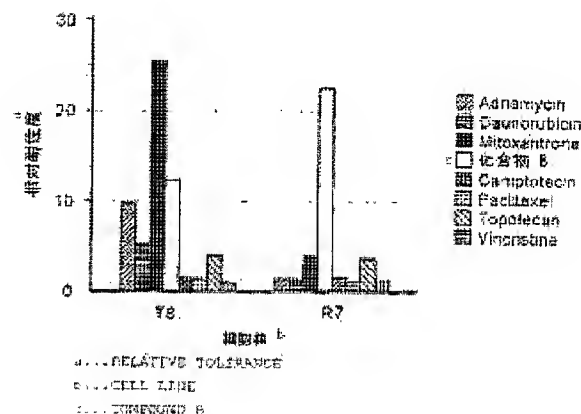
Cited documents:

WO9940110 (A1)
WO9855614 (A2)
XP001055042 (A)
XP001055043 (A)
XP001055044 (A)

more >>

Abstract of WO 0228894 (A1)

By using an anticancer agent having a unique structure which is never been reported as being transported by a known transporter protein capable of imparting tolerance to cancer cells, a cell line tolerant to this anticancer agent is established. Then a cDNA encoding a protein which is expressed at a high level in this tolerant strain is successfully isolated. Use of this gene together with the an anticancer agent and to select an anticancer agent which can be administered to patients with cancer. Moreover, a candidate compound for an inhibitor of the transporter can be screened thereby. By using a combination of the inhibitor thus obtained with the above-described anticancer agent, the sensitivity of cancer cells tolerant to the anticancer agent can be enhanced.



Data supplied from the esp@cenet database — Worldwide

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2002 年 4 月 11 日 (11.04.2002)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 02/28894 A1(51) 国際特許分類⁷: C07K 14/47, C12N 15/09, C07K
16/18, C12N 1/15, 1/19, 1/21, 5/10, C12P 21/02, 21/08,
A61K 45/00, 31/711, A61P 43/00, 35/00 // (C12P 21/02,
C12R 1:91) (C12N 5/10, C12R 1:91)[JP/JP]; 〒103-8416 東京都中央区日本橋本町2丁目2
番3号 Tokyo (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP01/08112

(72) 発明者; および

(22) 国際出願日: 2001 年 9 月 18 日 (18.09.2001)

(75) 発明者/出願人 (米国についてののみ): 駒谷 秀也
(KOMATANI, Hideya) [JP/JP]. 原 芳和 (HARA,
Yoshikazu) [JP/JP]. 小谷 秀仁 (KOTANI, Hidehito)
[JP/JP]. 中川 理奈子 (NAKAGAWA, Rinako) [JP/JP]; 〒
300-2611 茨城県つくば市大久保3番地 萬有製薬株式
会社 つくば研究所内 Ibaraki (JP).

(25) 国際出願の言語: 日本語

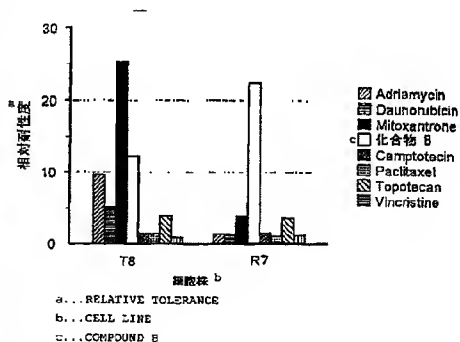
(26) 国際公開の言語: 日本語

(74) 代理人: 加藤朝道(KATO, Asamichi); 〒222-0033 神奈
川県横浜市港北区新横浜3丁目20番12号 望星ビル7
階 加藤内外特許事務所 Kanagawa (JP).(30) 優先権データ:
特願2000-303441 2000 年 10 月 3 日 (03.10.2000) JP(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB,
BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK,
DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU,
ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS,

[続葉有]

(54) Title: GENE RELATING TO DRUG TOLERANCE AND UTILIZATION THEREOF

(54) 発明の名称: 薬剤耐性関連遺伝子及びその使用



(57) Abstract: By using an anticancer agent having a unique structure which is never been reported as being transported by a known transporter protein capable of imparting tolerance to cancer cells, a cell line tolerant to this anticancer agent is established. Then a cDNA encoding a protein which is expressed at a high level in this tolerant strain is successfully isolated. Use of this gene together with the an anticancer agent and to select an anticancer agent which can be administered to patients with cancer. Moreover, a candidate compound for an inhibitor of the transporter can be screened thereby. By using a combination of the inhibitor thus obtained with the above-described anticancer agent, the sensitivity of cancer cells tolerant to the anticancer agent can be enhanced.

(57) 要約:

癌細胞に耐性を付与する既知の輸送体タンパク質によっては輸送されるという報告のない独自構造の抗癌剤を用いて、該抗癌剤に耐性な細胞株を樹立し、該耐性株に高度に発現しているタンパク質をコードするcDNAを単離することに成功した。この遺伝子とタンパク質を利用することにより、抗癌剤耐性細胞の検出及び癌患者に投与できる抗癌剤の選択が可能となる。更に、該輸送体に対する阻害候補化合物のスクリーニングが可能となり、得られた阻害剤を該抗癌剤と併用することにより抗癌剤耐性癌細胞の感受性を増強することができる。



LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO,
NZ, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM,
TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

添付公開書類:
— 国際調査報告書

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW,
MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM,
AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許
(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,
LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG,
CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

2文字コード及び他の略語については、定期発行される
各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語
のガイダンスノート」を参照。

明 細 書

薬剤耐性関連遺伝子及びその使用技術分野

本発明は医薬の分野で有用であり、より具体的には癌化学療法剤を排出し細胞に耐性を付与する新規タンパク質、それをコードするDNA、癌化学療法剤耐性細胞の検出方法、患者における癌化学療法剤の選択指標および癌化学療法剤耐性を克服する為の阻害剤のスクリーニング方法等に関するものである。

背景技術

癌化学療法剤に対する耐性は、従来の細胞毒性薬剤による癌治療における主要な問題である。腫瘍は最初は化学療法剤に良く反応するが、後には様々な薬剤に対しても耐性になり再発がおこる。このような化学療法剤耐性の主要原因として、薬剤排出による細胞内薬剤濃度の減少があげられる。これは癌細胞において化学療法薬剤を細胞外へ排出する輸送体の発現に依存した機構であり、該輸送体の代表例としてMDR 1 遺伝子にコードされるP-糖タンパク質（以下、P-gpと称する）及びMRP遺伝子にコードされる多薬剤耐性関連タンパク質（以下、MRPと称する）が報告されている。P-gpは多くの腫瘍タイプの多剤耐性に関係するとして古くから知られた分子ポンプであり、またMRPは最初に肺癌における多剤耐性に関係することから判明し、後に他の癌タイプでも発現することが判明した（Cole, S. P. C. et al., Science 258, 1650-1654 (1992)) (Slovak, M. L. et al., Cancer Res. 53, 3221-3225 (1993)) 輸送体である。

これらの遺伝子はいずれもABC輸送体スーパーファミリー (ATP-binding cassette transporter superfamily) の一員であり、細胞膜に局在しATPの加水分解を利用して基質を輸送する一群の分子である。

近年、新たなABCファミリー分子が次々と発見され、P-gpやMRPの他

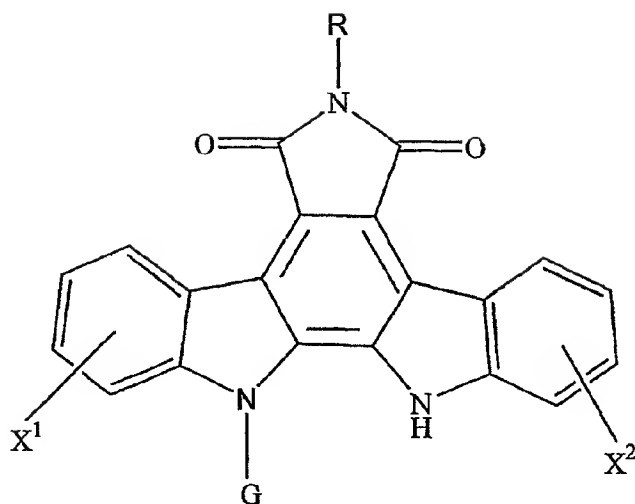
にも薬剤耐性への関与が示唆される分子ポンプが明らかになりつつある。このような分子の一つとして、ABCG2 (BCRP/MXR/ABCP) と称されるサブファミリーがある。このサブファミリーには胎盤特異的に発現する遺伝子としてABCP (Allikmetz, R. et al., Cancer Res. 58, 5337-5339 (1998))、アドリアマイシンで選択した耐性細胞株から取得された遺伝子としてBCRP (Doyle, A. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 95, 15665-15670 (1998))、及びミトキサントロンで選択した耐性細胞株から取得された遺伝子としてMXR (Miyake, K. et al., Cancer Res. 59, 8-13 (1999)) が各々報告された。これら3種の遺伝子は各遺伝子間で塩基置換に由来する1ないし4アミノ酸の相違がみとめられる。

BCRPとして報告された配列をMCF-7細胞に導入、発現させた細胞株の解析から、この遺伝子の発現がミトキサントロンやアドリアマイシンに耐性を付与することが示され、新たな多剤耐性因子として注目されている (Doyle, A. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 95, 15665-15670 (1998)) (WO99/40110)。

しかしながら、それらの報告ではアドリアマイシン、ダウノルビシン及びミトキサントロン等のアンスラキノン骨格を持つ抗癌化学療法剤と該遺伝子との関連についてのみ開示されているだけである。さらに、該遺伝子のアミノ酸置換と基質特異性との関連については何の開示も示唆もなされていない。

最近、ABCG2サブファミリー (BCRP/MXR/ABCP) の発現と前記アンスラキノン骨格を有さないトポテカンに対する耐性現象との相関が示唆される報告 (Maliepaard, M. et al., Cancer Res. 59, 4559-4563 (1999)) がなされたが明確な証明はなされていない。

一方、下記的一般式 (I)



(I)

〔式中、 X^1 および X^2 はそれぞれ独立に水素原子、ハロゲン原子、又はヒドロキシ基を示し、 R は水素原子、アミノ基、ホルミルアミノ基、又は1ないし3個のヒドロキシ基、置換基を有していてもよいピリジル基および置換基を有していてもよいチエニル基からなる群から選ばれる置換基によって置換されてもよい低級アルキルアミノ基であり、 G は五炭糖基、六炭糖基、又はアミノ基によって置換を有されてもよい五炭糖基若しくは六炭糖基を示す〕で表される化合物（以下、インドロカルバゾール系化合物と称する）に対する薬剤耐性機構に関しては、化合物-A（前記一般式（I）において、 X^1 は1-ヒドロキシ基、 X^2 は11-ヒドロキシ基、 R はホルミルアミノ基、 G は β -D-グルコピラノシル基を示す。）において、種々の細胞に対する細胞生育阻害効果と、その細胞内での該化合物-Aの蓄積量との相関が報告（Yoshinari, T. et al., Cancer Res. 55, 1310-1315 (1995) および, Kanazawa, F. et al., Cancer Res. 55, 2806-2813 (1995)）されている。

しかしながら、該報告では細胞内蓄積量の変化による耐性が前記P-gpとは関係無い作用によって起こることが開示されているにすぎず、上記の全ての報告を含め、過去に該インドロカルバゾール系化合物の細胞内蓄積量若しくは薬剤耐性に関与する因子を明らかにした報告は無い。

発明の課題

アンスラキノン骨格を持つ癌化学療法剤（アドリアマイシン、ドキソルビシン及びミトキサントロン等）に関しては、前記P-gp、前記MRP及び前記BCRPによる耐性が考えられるので好ましい癌化学療法剤とはいえない。このような状況下において、P-gp等で輸送されない特徴をもつ抗癌剤の開発が望まれている。

上述したインドロカルバゾール骨格を有する化合物は、前記P-gp、前記MRP及び前記BCRPによる耐性が報告されておらず、トポイソメラーゼ阻害剤である化合物-A (Yoshinari, T. et al., Cancer Res. 55, 1310-1315 (1995))、化合物-B (前記一般式(I)において、X¹は2-ヒドロキシ基、X²は10-ヒドロキシ基、Rは(1-ヒドロキシメチル-2-ヒドロキシ)エチルアミノ基、Gはβ-D-グルコピラノシル基を示す。)(Yoshinari, T. et al., Cancer Res. 59, 4271-4275 (1999))及びタンパク質酸化酵素阻害剤であるUCN-01(Akinaga, S. et al., Cancer Res. 51, 4888-4892 (1991))が新規な抗癌剤の候補として期待されている。しかしながら、前記Yoshinariの開示からインドロカルバゾール系化合物の細胞内蓄積量変化が何によって起こるかを究明することは重要である。

従って、本発明は、インドロカルバゾール系化合物の細胞内蓄積に関連するタンパク質とそれをコードするポリヌクレオチドを提供することを課題とする。また、本発明はこのタンパク質をコードするポリヌクレオチドや該タンパク質の抗体を用いて癌細胞や癌患者における当該遺伝子の発現の検出方法を提供することを課題とする。さらに、本発明は該遺伝子及びタンパク質を利用した抗癌剤耐性克服剤のスクリーニング方法を提供することを課題とする。

発明の開示

本発明者らは上記の課題を解決するために鋭意研究を行った。まず、本発明者

等は前記化合物－Aに耐性となる細胞株の樹立を行った。これは具体的にはマウスLY細胞株、ヒトHCT116細胞株、ヒトPC-13細胞株を長期間化合物－A存在下に培養することにより達成した。得られた化合物－A耐性細胞株、すなわちLY/NR2, HCT116/NR1, PC-13/NR13, または自然耐性株HeLa#7ではいずれにおいても化合物－A等のインドロカルバゾール系化合物に対し50～数千倍の耐性を示す一方、カンプトテシン、アドリアマイシン、ミトキサントロンなどの他の抗癌剤にはせいぜい20倍程度の交差耐性しか示さなかった為、これらの耐性細胞株においてインドロカルバゾール系化合物特異的な耐性メカニズムの存在が考えられた。またこれらの耐性細胞株において化合物－A等のインドロカルバゾール系化合物の細胞内蓄積が低下していることを見出したことから、耐性株においてインドロカルバゾール系化合物の細胞内濃度を下げ、耐性をもたらしてる因子の存在が予想された。

次に、本発明者はDNAチップを用いてマウス化合物－A耐性細胞株LY/NR2と親株LY細胞における全既知遺伝子転写産物の発現の比較を行い、その結果最も耐性株特異的に発現が上昇している遺伝子として、ABCトランスポーターの一員であるABCG2サブファミリーと高いホモロジーを有する遺伝子配列（本発明のABCG2）を見出した。

ノーザン解析により該遺伝子がマウスLY/NR2細胞のみならず、取得されたすべてのヒト由来耐性細胞でも過剰発現しているのが見出された。従って、すべての化合物－A耐性細胞で本発明のABCG2遺伝子が高発現しているという事実と、前記BCRP等が抗癌剤排出に関与しているという従来知見から、本発明の遺伝子産物がインドロカルバゾール系化合物に対する耐性を付与する因子であることが強く示唆された。

そこで本発明者等はヒト自然耐性細胞株HeLa#7より従来のヒトABCG2の配列をもとにデザインしたプライマーを用いてRT-PCR法により本発明の全長cDNAを単離し、塩基配列の解析から、本発明の遺伝子の配列がこれまで報告されてきたどのABCG2の配列とも異なる新規なものであるということを見出した。即ち本発明の遺伝子はBCRPとして報告されているアミノ酸配列の482番目のスレオニンをコードしているコドン配列が一塩基置換によりアル

ギニンをコードする配列に変化していた。さらに本発明者は、ヒト正常組織、すなわち胎盤および腎臓由来のcDNAから本発明者の得たABC G 2配列と既存のABC G 2配列、即ちBCRP、MXRと異なる配列を示す部分に注目して塩基配列を決定したところ、ヒト正常組織では本発明者がHeLa # 7から得た配列と同じアミノ酸配列のタンパク質が発現していることが明かとなった。

本発明者等は、本発明の遺伝子がインドロカルバゾール系化合物に対する耐性を細胞に付与する能力があるかどうかを検討した。即ち、HeLa # 7から単離した全長遺伝子を発現ベクターに繋ぎ、PC-13細胞で強制発現させた安定形質発現株を作成した。その結果、本発明のABC G 2を強制発現させた細胞では化合物-A等のインドロカルバゾール系化合物に対し約10～20倍耐性となったことから、本発明の遺伝子がインドロカルバゾール系化合物に対する耐性因子であることが判明した。同時に、本発明者は本発明の遺伝子発現細胞が前記BCRPで報告されたミトキサントロン耐性及びアドリアマイシン耐性にはならないことを見出し、本発明の一アミノ酸異なる遺伝子が新規な活性をもつ、新しいタイプの遺伝子であることを証明した。

さらに本発明者等は本発明のABC G 2とBCRPとして報告されている配列(Doyle, A. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 95, 15665-15670 (1998)) (WO 99/40110)との間にみられる、一アミノ酸の違いと各薬剤に対する耐性の関係を明らかにするために、本発明のABC G 2と、アミノ酸置換の導入によりBCRPとして報告されているコドン482番目がスレオニンをコードするようになったABC G 2 (ABC G 2-482T)をそれぞれMCF-7細胞に導入して、性質を比較した。

その結果、ABC G 2-482Tを導入した細胞はインドロカルバゾール系化合物である化合物-Bの他にミトキサントロンやアドリアマイシンに対して耐性を示したのに対して、本発明のABC G 2を導入したものは化合物-Bのみに強い耐性を示し、インドロカルバゾール化合物に選択的な耐性を示すことが明らかとなった。また細胞内へのこれらの化合物の蓄積に関しても、同様な選択性の違いが認められ、本発明のABC G 2がもたらすインドロカルバゾール選択的耐性

がこの分子の基質特異的な輸送によるものであることが示唆された。これにより、かつてBCRPとして報告されていたABCG2と本発明のABCG2の性質に関して明確な違いが見いだされ、またその違いがコドン482の1アミノ酸の違いに基づいたものであることが示された。

従って、本発明者等は本発明のABCG2遺伝子がインドロカルバゾール系化合物選択的な耐性を細胞に付与するという証明から、本発明の遺伝子、タンパク及びそれらの断片、或いは抗体が、癌患者での該遺伝子の発現検出や、がん患者がインドロカルバゾール系化合物に対して選択的に耐性であるか否かの予測等に応用可能であり、更には、該遺伝子の発現調節物質若しくは該遺伝子産物であるタンパク質の活性を調節するような物質のスクリーニング及びこれらの物質による薬剤耐性克服等へ応用しうることを見出した。

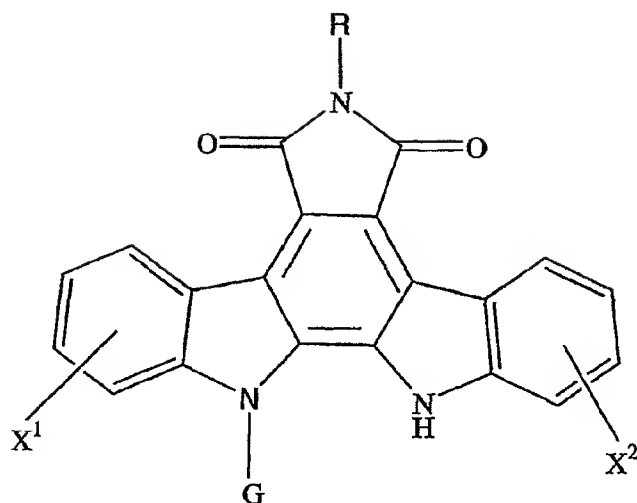
すなわち本発明は、哺乳動物細胞に癌化学療法剤に対する耐性を付与するヒトABCG2タンパク質（以下本発明のABCG2と呼ぶ）及びそのタンパク質をコードするポリヌクレオチド、並びにそれらの製造および用途に関し、より具体的には、

（１） 下記（Ａ）または（Ｂ）に記載のアミノ酸配列からなり、かつ哺乳動物細胞に癌化学療法剤耐性を付与するタンパク質：

（Ａ）配列番号：２に記載のアミノ酸配列、

（Ｂ）配列番号：２に記載のアミノ酸配列において１もしくは複数のアミノ酸が置換、欠失若しくは付加したアミノ酸配列、

（２） 前記癌化学療法剤が、下記一般式（Ｉ）で表される化合物であることを特徴とする（１）に記載のタンパク質：



(I)

式中、 X^1 および X^2 はそれぞれ独立に水素原子、ハロゲン原子、又はヒドロキシ基を示し、 R は水素原子、アミノ基、ホルミルアミノ基、又は1ないし3個のヒドロキシ基、置換基を有していてもよいピリジル基および置換基を有していてもよいチエニル基からなる群から選ばれる置換基によって置換されてもよい低級アルキルアミノ基であり、 G は五炭糖基、六炭糖基、又はアミノ基によって置換を有されてもよい五炭糖基若しくは六炭糖基を示す、

(3) (1) または (2) に記載のタンパク質の部分ペプチド、

(4) (1) から (3) のいずれかに記載のタンパク質もしくは部分ペプチドをコードするポリヌクレオチド、または該ポリヌクレオチドに相補的な配列からなるポリヌクレオチド、

(5) 前記ポリヌクレオチドのDNA配列が、配列番号：1に表されるDNA配列のコード領域またはその相補的な配列の、少なくとも一部分からなることを特徴とする(4)に記載のポリヌクレオチド、

(6) 上記一般式(I)で表される化合物に対する耐性を有する哺乳動物細胞を検出するために用いる、(4) または (5) に記載のポリヌクレオチド、

(7) 配列番号：1で表されるDNA配列において1489番目の塩基(G)を含む15～100の連続したDNA配列またはその相補的な配列からなるポリヌクレオチド、

(8) (4) または (5) に記載のポリヌクレオチドを含有することを特徴と

する組換えベクター、

(9) (8)に記載の組換えベクターを保持する形質転換体、

(10) (9)に記載の形質転換体を培養し、該形質転換体またはその培養上清から発現させたタンパク質または部分ペプチドを回収する工程を含む、(1)から(3)のいずれかに記載のタンパク質または部分ペプチドの製造方法、

(11) (1)から(3)のいずれかに記載のタンパク質または部分ペプチドに特異的に結合する抗体、

(12) 上記一般式(I)で表される化合物に対して耐性を有する哺乳動物細胞を検出するために用いる、(11)記載の抗体、

(13) (1)または(2)記載のタンパク質の発現を抑制するアンチセンスヌクレオチド、

(14) (1)または(2)記載のタンパク質の発現を指標とすることにより癌患者の化学療法剤に対する耐性を予測する方法、

(15) 前記癌化学療法剤が、上記一般式(I)で表される化合物である(14)に記載の方法、

(16) (1)または(2)記載のタンパク質の機能を阻害する物質をスクリーニングする方法であって、

(a) 前記タンパク質と、癌化学療法剤と、候補化合物とを接触させる工程、及び

(b) 前記タンパク質の活性を抑制する候補化合物を選択する工程、を含むことを特徴とする阻害剤のスクリーニング方法、

(17) 前記タンパク質の活性が、前記癌化学療法剤を基質として、該基質との結合活性、該基質結合時のATP分解活性、または該基質の膜輸送活性である(16)に記載のスクリーニング方法、

(18) (1)または(2)記載のタンパク質の機能を阻害する物質をスクリーニングする方法であって、

(a) (1)または(2)記載のタンパク質を発現する哺乳動物細胞に、癌化学療法剤、及び候補化合物を接触させる工程、及び

(b) 前記癌化学療法剤が有する前記哺乳動物細胞に対する毒性を増強する候

補化合物を選択する工程、

を含むことを特徴とする阻害剤のスクリーニング方法、

(19) (16) から (18) いずれかに記載の方法によって得られる阻害剤、
(20) (19) 記載の阻害剤により、(1) 記載のタンパク質の機能を阻害する方法、

(21) (11) または (12) 記載の抗体により、(1) 記載のタンパク質の機能を阻害する方法、

(22) (13) 記載のアンチセンスヌクレオチドにより、(1) 記載のタンパク質の発現を阻害する方法、

(23) (20) から (22) のいずれかの方法により (1) に記載のタンパク質の機能または発現を阻害することを特徴とする、癌患者の化学療法剤に対する感受性を高める方法、

(24) (23) 記載の化学療法剤が上記一般式 (I) で表される化合物であることを特徴とする方法、に関する。

図面の簡単な説明

図1は、化合物-A耐性細胞株における本願ABC G 2遺伝子の転写産物の発現を示す。

図2は、本願ABC G 2遺伝子を導入したPC-13細胞株におけるABC G 2転写産物の発現を示す。

図3は、本願ABC G 2遺伝子を導入したPC-13細胞株における化合物-Bの蓄積を示す。

図4は、二段階PCRを用いたABC G 2遺伝子へのアミノ酸置換の導入方法を示す。(a)：塩基置換部位のプライマー設計。(b)：二段階PCRの概略。

図5は、本願ABC G 2若しくはABC G 2-482Tを導入したMCF-7細胞における各ABC G 2転写物の発現を示す。図中、「ベクター」はベクターのみを導入したMCF-7を、「T8」はABC G 2-482Tを導入したMCF-7 (MCF-7/T8) を、「R7」は本願のABC G 2を導入したMCF

ー7 (MCF-7/R7) をそれぞれ示す。

図6は、本願ABCG2若しくはABCG2-482Tを導入したMCF-7細胞の各種抗癌剤に対する相対耐性度を示す。図中、「T8」はABCG2-482Tを導入したMCF-7 (MCF-7/T8) を、「R7」は本願のABCG2を導入したMCF-7 (MCF-7/R7) をそれぞれ示す。

図7は、本願ABCG2若しくはABCG2-482Tを導入したMCF-7細胞における各種薬剤の蓄積量を示す。図中、「ベクター」はベクターのみを導入したMCF-7を、「T8」はABCG2-482Tを導入したMCF-7 (MCF-7/T8) を、「R7」は本願のABCG2を導入したMCF-7 (MCF-7/R7) をそれぞれ示す。

発明の実施の形態

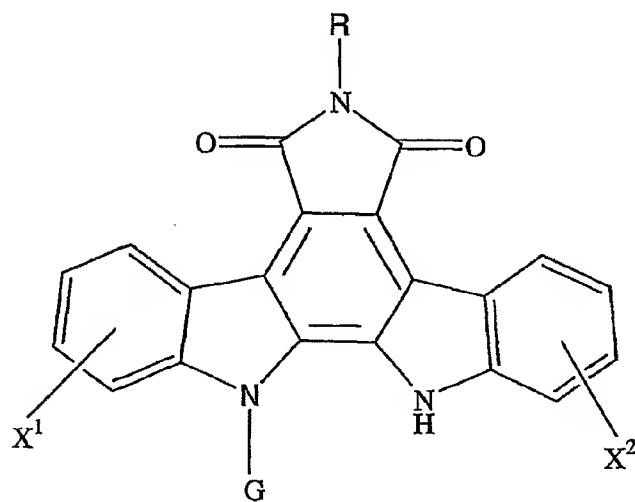
本発明は、新規な薬剤耐性関連遺伝子とその遺伝子産物に関する。本発明者らにより単離された哺乳動物細胞に癌化学療法剤耐性を付与するタンパク質「本発明のABCG2」(ヒトABCG2)のcDNAの塩基配列を配列番号：1に、該cDNAによりコードされる「本発明のABCG2」タンパク質のアミノ酸配列を配列番号：2に示す。本発明のABCG2のcDNA配列はインドロカルバゾール系化合物の一種である化合物-A耐性細胞で高発現している遺伝子のスクリーニングを基に見出されたものであり、ABC輸送体スーパーファミリーに属する前記ABCG2サブファミリーのうちBCRPとして開示された遺伝子配列と2塩基違いの配列を有する。それに伴い、本発明のABCG2のcDNAは該BCRPと1アミノ酸違いのタンパク質を形成する新規アミノ酸配列をコードしている。

しかしながら、本発明の課題解決の過程において、本発明のABCG2若しくはBCRPとして開示された遺伝子を形質導入した細胞株では、種々の薬剤に対する耐性度や細胞内薬剤蓄積量が異なる事が確認され、本発明のABCG2を過剰発現若しくは形質導入した細胞株では、インドロカルバゾール系化合物に対し選択的に耐性を示すことが見出された。すなわち、本発明のABCG2は1アミノ酸異なることにより上記BCRPとは異なる性質を有するタンパク質をコード

する新規な薬剤耐性関連遺伝子であることが判明した。

本発明において「哺乳動物細胞」とは哺乳類に属する動物の生体を構成している組織、細胞、又はそれらの細胞を体外培養したものを意味する。

本発明において「癌化学療法剤」とは癌の治療の目的で用いられる薬剤を意味し、合成化合物、植物若しくは微生物由来の天然化合物、または前記天然化合物をもとに合成される半合成化合物が含まれる。好ましくは、下記一般式 (I)



(I)

〔式中、 X^1 および X^2 はそれぞれ独立に水素原子、ハロゲン原子、又はヒドロキシ基を示し、 R は水素原子、アミノ基、ホルミルアミノ基、又は1ないし3個のヒドロキシ基、置換基を有していてもよいピリジル基および置換基を有していてもよいチエニル基からなる群から選ばれる置換基によって置換されてもよい低級アルキルアミノ基であり、 G は五炭糖基、六炭糖基、又はアミノ基によって置換を有されてもよい五炭糖基若しくは六炭糖基を示す〕で表される化合物（以下、インドロカルバゾール系化合物と総称する）を意味し、さらに好ましくは該一般式 (I) において、〔式中、 X^1 および X^2 はそれぞれ独立に、ハロゲン原子又はヒドロキシ基を示し、 R は水素原子、ホルミルアミノ基、又は1ないし3個のヒドロキシ基、置換基を有していてもよいピリジル基および置換基を有していてもよいチエニル基からなる群から選ばれる置換基によって置換されてもよい低級アルキルアミノ基であり、 G はアミノ基によって置換を有されてもよい六炭糖基を

示す]で表される化合物を意味する。上記のインドロカルバゾール系化合物の製造方法等については、先の特許出願・特許（ヨーロッパ特許公開公報 0528030A1、米国特許第5591842号明細書、米国特許第5668271号明細書、米国特許第5804564号明細書、WO95/30682、WO96/04293、WO98/07433、特開平10-245390）で開示されている。

「癌化学療法剤耐性」とは前記癌化学療法剤の治療効果に動物細胞が抵抗性を示すことを意味し、癌細胞の、該癌化学療法剤の細胞外排出の亢進による耐性、標的酵素の変異による耐性、体内で活性化を受けて薬効を発揮する薬剤についての薬剤活性化機構の低下による耐性、または障害修復機構の亢進による耐性等のうちいずれをも意味するが、好ましくは癌細胞の該癌化学療法剤排出の亢進によって細胞内薬剤濃度が低下することに起因する耐性を意味する。

「癌化学療法剤に対する耐性を哺乳動物細胞に付与する」とは、前記癌化学療法剤の細胞外排出能力亢進を哺乳動物細胞に付与することを意味し、好ましくはこの細胞外排出能力の亢進が、ABCトランスポータースーパーファミリー（ATP結合カセットスーパーファミリー：Higgin, C. F. (1992) *Annu. Rev. Cell. Biol.* 8., 67-113）に属しABCG2サブファミリーに属する本発明のABCG2遺伝子の増加、本発明のABCG2遺伝子の転写産物の増加、または本発明のABCG2遺伝子の翻訳産物の過剰発現により付与されることを意味する。さらに「癌化学療法剤に対する耐性を哺乳動物細胞に付与する」とは、本発明のABCG2遺伝子産物の作用により、哺乳動物細胞内に取り込まれた該癌化学療法剤が細胞外に排出され結果的に該癌化学療法剤の細胞内の濃度が減少することにより該癌化学療法剤に対する耐性を哺乳動物細胞に付与することを意味する。

本発明の「ABCG2タンパク質」は、天然のタンパク質の他、遺伝子組み換え技術を利用した組換えタンパク質として調製したものをも含む。天然のタンパク質は、例えば、本発明のヒト「ABCG2」タンパク質が発現していると考えられる胎盤など組織の抽出液に対し、後述する「抗ABCG2抗体」を用いたアフィニティークロマトグラフィーを行う方法により調製することが可能である。

一方、組換えタンパク質は、後述するように本発明のヒトABC G 2タンパク質をコードするDNAで形質転換した細胞を培養することにより調製することが可能である。また、当業者であれば、公知の方法を用いて本発明のヒトABC G 2タンパク質（配列番号：2）中のアミノ酸の置換などの修飾を行い、本発明のタンパク質と同等の機能、すなわちインドロカルバゾール系化合物との結合活性またはインドロカルバゾール系化合物の輸送活性等を有する改変タンパク質を調製することが可能である。また、タンパク質のアミノ酸の変異は天然においても生じうる。このようにアミノ酸の置換、欠失、付加などにより天然型のタンパク質に対してアミノ酸配列が変異した変異体であって、天然型のタンパク質と同等の機能を有するタンパク質も本発明のABC G 2タンパク質に含まれる。当業者に公知のアミノ酸を改変する方法としては、例えば、Kunkel法（Kunkel, T. A. et al., *Methods Enzymol.* 154, 367-382 (1987))、ダブルプライマー法（Zoller, M. J. and Smith, M., *Methods Enzymol.* 154, 329-350 (1987))、カセット変異法（Wells, et al., *Gene* 34, 315-23 (1985))、メガプライマー法（Sarkar, G. and Sommer, S. S., *Biotechniques* 8, 404-407 (1990))が挙げられる。タンパク質におけるアミノ酸の変異数や変異部位はその機能が保持される限り制限はないが、機能的に同等なタンパク質におけるアミノ酸の変異数は、通常、全アミノ酸の10%以内、好ましくは10アミノ酸以内、さらに好ましくは本発明のタンパク質のアミノ酸配列において482番目のアミノ酸がアルギニンであり且つ変異数が3アミノ酸以内（例えば、1アミノ酸）である。

また、本発明は、上記本発明のヒトABC G 2タンパク質の部分ペプチドを包含する。本発明の部分ペプチドとしては、例えば、本発明のABC G 2タンパク質のATP結合領域を含む部分ペプチド（アミノ酸61-270）、本発明のタンパク質のアミノ酸配列において482番目のアミノ酸であるアルギニンを含む部分ペプチド、インドロカルバゾール系化合物との結合活性を有する部分ペプチド及び細胞表面に発現させた場合にインドロカルバゾール系化合物を細胞外へ排

出する活性を有する部分ペプチド等が挙げられるがこれに限定されない。これら部分ペプチドは上記の本発明のA B C G 2タンパク質同様、例えば抗体の調製または後述する医薬品候補化合物のスクリーニングもしくはインドロカルバゾール系化合物で表される化合物の治療効果を高める物質のスクリーニングに利用することができる。また、インドロカルバゾール系化合物との結合活性を有するが細胞外への薬剤排出活性を有しない部分ペプチドは、本発明のA B C G 2タンパク質の競合阻害剤になり得る。このような本発明の部分ポリペプチドは、少なくとも15アミノ酸、好ましくは20アミノ酸以上の鎖長を有すると考えられる。本発明の部分ペプチドは、例えば、遺伝子工学的手法、公知のペプチド合成法、或いは本発明のタンパク質を適当なペプチダーゼで切断する事によって作成することができる。

また、本発明は、上記本発明のタンパク質又はその部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドに関する。本発明で使用する「ポリヌクレオチド」とは一般に、ポリリボヌクレオチドまたはポリデオキシリボヌクレオチドのいずれをもいい、それらは非修飾RNAまたはDNA、あるいは修飾RNAまたはDNAであってもよく、例えばDNA、cDNA、ゲノムDNA、mRNA、未プロセッシングRNAおよびそれらの断片などが挙げられ、それらの長さは特に限定しない。

「タンパク質もしくは部分ペプチドをコードするポリヌクレオチド」とは本発明のA B C G 2タンパク質やその部分ペプチドをコードしうる限り、遺伝暗号の縮重に基づく任意の塩基配列を有するポリヌクレオチドが含まれ、該ポリヌクレオチドとしては、例えば、本発明のA B C G 2タンパク質やその部分ペプチドをコードするDNA、mRNA等のRNAであり、二本鎖であっても、一本鎖であってもよい。二本鎖の場合は、二本鎖DNA、二本鎖RNAまたはDNA:RNAのハイブリッドでもよい。本発明のA B C G 2タンパク質やその部分ペプチドをコードするDNAとしては、ゲノムDNA、ゲノムDNAライブラリー、上記した細胞・組織由来のcDNA、上記した細胞・組織由来のcDNAライブラリー又は合成DNAのいずれでもよい。

本発明のヒトA B C G 2タンパク質をコードするcDNAは、例えば、配列番号: 1に記載のcDNAあるいはその断片、それらに相補的なRNA、または該

cDNAの配列の一部を含む合成オリゴヌクレオチドを ^{32}P などで標識し、本発明のABC G 2タンパク質が発現している組織（例えば、胎盤）由来のcDNAライブラリーにハイブリダイズさせることによりスクリーニングすることができる。あるいは、これらcDNAの塩基配列に対応するオリゴヌクレオチドを合成し、適当な組織（例えば、胎盤）由来のcDNAを鋳型にポリメラーゼ連鎖反応により増幅し、クローニングすることもできる。ゲノムDNAは、例えば、配列番号：1に記載のcDNAあるいはその断片、それらに相補的なRNA、または該cDNAの配列の一部を含む合成オリゴヌクレオチドを ^{32}P などで標識し、ゲノムDNAライブラリーにハイブリダイズさせることによりスクリーニングすることができる。あるいは、これらcDNAの塩基配列に対応するオリゴヌクレオチドを合成し、ゲノムDNAを鋳型にポリメラーゼ連鎖反応により増幅し、クローニングすることもできる。一方、合成DNAは、例えば、配列番号：1に記載のcDNAの部分配列を持つオリゴヌクレオチドを化学合成し、アニーリングさせて二本鎖にし、DNAリガーゼで結合させることにより調製することができる（Khorana, H. G. et al., J. Biol. Chem. 251, 565-570 (1976); Goeddel D. V. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 106-110 (1979)）。

また、本発明のポリヌクレオチドは、前記の一般式（I）で表される化合物に対する耐性を有する哺乳動物細胞を検出するために用いることができる。すなわち、検体となる哺乳動物細胞のmRNAを一般的な方法で抽出し、本発明のポリヌクレオチドをプローブとしたノーザンハイブリダイゼーションによって、或いは、抽出RNAを本発明のポリヌクレオチドの配列上にハイブリダイズする事ができるをプライマーセットを用いてRT-PCRを行う等、何らかの方法により該ABC G 2 mRNA量を測定し、mRNA量の過剰発現を指標として前記の一般式（I）で表される化合物に対する耐性を有する哺乳動物細胞を検出することができる。

また、本発明のABC G 2タンパク質に特徴的なmRNAまたはゲノムDNAを検出するために、ABC G 2タンパク質の482番目のアルギニン残基のコード

ンに対応する多型を検出することができる。このような多型を検出する方法には、例えば、配列番号：1に表される塩基配列において、1489番目の塩基（G、多型部位）を含む15～100の連続したDNA配列またはその相補的な配列からなるポリヌクレオチドを固定化したDNAチップ等を用いて、特定の癌細胞から抽出したmRNA等とハイブリダイズさせ上記多型部位の塩基配列を検出することができる。

本発明のDNAは、組換えタンパク質の生産に有用である。即ち、上記本発明のABC₂タンパク質をコードするDNA（例えば、配列番号：1に記載のcDNA）を適当な発現ベクターに挿入し、該ベクターを適当な細胞に導入して得た形質転換体を培養し、発現させたタンパク質を精製することにより本発明のヒト由来ABC₂タンパク質を組換えタンパク質として調製することが可能である。

また、本発明は、本発明のポリヌクレオチドを含有することを特徴とする組換えベクターに関する。「組換えベクター」とは外来性DNAを組み込み、宿主細胞で増えることのできるDNAを指し、これらは自己複製能のあるプラスミド、ファージ、ウイルスなどを改良して作られる。本発明の組換えベクターを作製するために用いるプラスミド等としては、挿入したポリヌクレオチドを安定に保持するものであれば特に制限されず、例えば、宿主が大腸菌*Escherichia coli*の場合、プラスミドベクターpET-3（Rosenberg, A. H. et al., Gene 56, 125-35 (1987)）、pGEX-1（Smith, D. B. and Johnson, K. S., Gene 67, 31-40 (1988)）などが用いられる。宿主が分裂酵母*Schizosaccharomyces pombe*の場合には、プラスミドベクターpESP-1（Lu, Q. et al., Gene 200, 135-144 (1997)）などが用いられる。宿主が昆虫細胞の場合には、バキュロウイルスベクターpBacPAK8/9（クロンテク社）などが用いられる。一方、宿主が哺乳動物細胞、例えば、チャイニーズハムスター卵巢由来細胞CHO、ヒトHeLa細胞などの場合、pMSG（アマシャム・ファルマシア社）、

p c DNA (インビトロジェン社) などのベクターが用いられる。

また、本発明は、本発明の組換えベクターを保持する形質転換体に関する。「形質転換体」とは組換えベクターにより宿主細胞に外来DNAが組み込まれた細胞であり、本発明の組換えベクターが導入される宿主細胞は原核細胞であっても真核細胞であっても良く、例えば細菌、酵母細胞、昆虫細胞、動物細胞など本発明の目的で使用できるならいずれの細胞であっても良い。具体的には次のような方法で組換えベクターを宿主細胞に導入し、形質転換体を得ることができる。大腸菌の形質転換は、Hanahan法 (Hanahan, D., J. Mol. Biol. 166, 557-580 (1983))、電気穿孔法 (Dower, W. J. et al., Nucl. Acids Res. 16, 6127-6145 (1988)) などで行う。酵母の形質転換は、例えば、スフェロプラスト法 (Beach, D. and Nurse, P., Nature 290, 140 (1981))、酢酸リチウム法 (Okazaki, K. et al., Nucleic Acids Res. 18, 6485-6489 (1990)) などにより行われる。昆虫細胞の形質転換は、例えば、バイオ/テクノロジー (Bio/Technology), 6, 47-55 (1980)) などに記載の方法に従って行うことができる。哺乳動物細胞への組換えDNAの導入は、リン酸カルシウム法 (Graham, F. L. and van der Eb, A. J., Virology 52, 456-467 (1973))、DEAE-デキストラン法 (Sussman, D. J. and Milman, G., Mol. Cell. Biol. 4, 1641-1643 (1984))、リポフェクション法 (Felgner, P. L. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 84, 7413-7417 (1987))、電気穿孔法 (Neumann, E. et al., EMBO J. 1, 841-845 (1982)) などで行われる。

また、本発明は、本発明の形質転換体を用いた、本発明のタンパク質又はその部分ペプチドの製造方法に関する。形質転換体において発現させた組換えタンパク質は、該形質転換体又はその培養上清からこの分野の標準的な方法に従い単離

することができる。ここで言う標準の方法とは、硫酸アンモニウム沈殿、カラムクロマトグラフィー（例えば、イオン交換、ゲル濾過、アフィニティークロマトグラフィーなど）、電気泳動などを包含する。また、例えば、N末端にヒスチジン残基のタグ、グルタチオンSトランスフェラーゼ（GST）などを結合した融合タンパク質の形で合成し、金属キレート樹脂、GST親和性レジンに結合させることにより精製することができる（Smith, M. C. et al., J. Biol. Chem. 263, 7211-7215 (1988)）。例えば、ベクターとしてpESP-1を用いた場合、目的のタンパク質は、グルタチオンSトランスフェラーゼ（GST）との融合タンパク質として合成されるため、GST親和性レジンに結合させることより組換えタンパク質を精製できる。融合タンパク質から目的タンパク質を分離するには、例えば、トロンビン、血液凝固因子Xaなどで切断する。

また、本発明は、本発明のヒトABCG2タンパク質に結合する抗体に関する。本発明のタンパク質に結合する抗体は、当業者に公知の方法（例えば、「新生物化学実験講座1，タンパク質I，389-406，東京化学同人」参照）により調製することが可能である。ポリクローナル抗体の調製は、例えば、以下の如く行う。ウサギ、モルモット、マウス、ニワトリなどの免疫動物に適量の本発明のヒトABCG2タンパク質もしくはその部分ペプチドを投与する。投与は、抗体産生を促進するアジュバント（FIAやFCA）と共に行ってもよい。投与は、通常、数週間ごとに行う。免疫を複数回行うことにより、抗体価を上昇させることができる。最終免疫後、免疫動物から採血を行うことにより抗血清が得られる。この抗血清に対し、例えば、硫酸アンモニウム沈殿や陰イオンクロマトグラフィーによる分画、プロテインAや固定化抗原を用いたアフィニティー精製を行うことにより、ポリクローナル抗体を調製することができる。一方、モノクローナル抗体の調製は、例えば、以下の如く行う。本発明のABCG2タンパク質もしくはその部分ペプチドを、上記と同様に免疫動物に免疫し、最終免疫後、この免疫動物から脾臓またはリンパ節を採取する。この脾臓またはリンパ節に含まれる抗体産生細胞とミエローマ細胞とをポリエチレングリコールなどを用いて融合し、ハイブリドーマを調製する。目的のハイブリドーマをスクリーニングし、これを

培養し、その培養上清からモノクローナル抗体を調製することができる。モノクローナル抗体の精製は、例えば、硫酸アンモニウム沈殿や陰イオンクロマトグラフィーによる分画、プロテインAや固定化抗原を用いたアフィニティー精製により行うことができる。これにより調製された抗体は、本発明のヒトABC G 2タンパク質のアフィニティー精製のために用いられる他、本発明のヒトABC G 2タンパク質の発現量の検出などに利用することが可能である。また、該抗体により哺乳動物細胞での該ヒトABC G 2タンパク質の発現量を検出し、その過剰発現を指標として前記の一般式（I）で表される化合物に対する耐性を有する哺乳動物細胞を検出することができる。また、この抗体による癌細胞や癌患者におけるヒトABC G 2タンパク質の検出は該タンパク質の過剰発現に起因する疾患や薬剤耐性の診断に利用でき、更にこの抗体はそれらの疾患や薬剤耐性に対する抗体治療にも利用することが可能である。

抗体治療に用いる場合、ヒト型抗体もしくはヒト抗体であることが好ましい。ヒト型抗体は、例えば、マウス・ヒトキメラ抗体であれば、本発明のABC G 2タンパク質に対する抗体を産生するマウス細胞から抗体遺伝子を単離し、そのH鎖定常部をヒトIgE H鎖定常部遺伝子に組換え、マウス骨髓腫細胞J 5 5 8 Lに導入することにより調製できる（Neuberger, M. S. et al., Nature 314, 268-270 (1985)）。また、ヒト抗体は、免疫系をヒトと入れ換えたマウスに本発明のABC G 2タンパク質を免疫することにより調製することが可能である。

また、本発明は、本発明のタンパク質の発現を抑制するアンチセンスヌクレオチドに関する。本発明の「アンチセンスヌクレオチド」は本発明のABC G 2タンパク質およびその部分ペプチドをコードするmRNAの任意の部分、或いは、mRNAの5'または3'非翻訳領域の任意の部分と特異的にハイブリダイズし、mRNAの翻訳を防止できる配列を有するものである。アンチセンスヌクレオチドは本発明のABC G 2タンパク質およびその部分ペプチドをコードするcDNA配列の任意の部分と特異的にハイブリダイズしうる配列を有し得る。具体的には、配列番号：1に示すヌクレオチド配列に基づいてアンチセンスヌクレオチドをデザインすることができる。示した配列のコード領域または非翻訳領域の任意

の部分の配列に対して相補的な配列を有するアンチセンスヌクレオチドをデザインすることができる。本発明のアンチセンスヌクレオチドはRNA、DNA、あるいは修飾された核酸（RNA、DNA）であっても良く、修飾された糖、塩基、結合を含有していて良い。修飾された核酸の具体例としては核酸の硫黄誘導体やチオホスフェート誘導体などが挙げられるが、それに限定されるものではない。

アンチセンスヌクレオチドの阻害活性は、本発明の形質転換体、ABC G 2タンパク質の生体内や生体外の遺伝子発現系、あるいはABC G 2タンパク質の生体内や生体外の翻訳系を用いて調べることができる。該アンチセンスヌクレオチド自体は公知の各種の方法で細胞に適用できる。例えば、該アンチセンスヌクレオチドはリボソーム、ミクロスフェアのような特殊な形態で供与されたり、リン酸基骨格の電荷を中和するように働くポリリジンのようなポリカチオン体、細胞膜との相互作用を高めたり核酸の取込みを増大せしめるような脂質（例えば、ホスホリピド、コレステロールなど）といった疎水性のものを付加された形態で与えられることができ、培養細胞だけに限らず遺伝子治療にも適用可能である。また、該アンチセンスヌクレオチドは、オリゴヌクレオチドを上記のように外から投与する方法に限らず、生体内で該アンチセンスヌクレオチドを発現させる事が可能であるベクターなどを投与する方法でも良い。特表平11-511965では多剤耐性関連タンパク質をコードするヒトMDR 1およびMRP遺伝子の発現を抑制するアンチセンスオリゴヌクレオチドによる、多剤耐性細胞の薬剤に対する感受性増加が示されている。また、該先行技術中に記載されている方法に準じて好ましい標的部位を選択し本発明のアンチセンスヌクレオチドの配列を設計することができる。本発明のアンチセンスヌクレオチドは本発明のABC G 2タンパク質を高発現している薬剤耐性癌細胞および癌患者に投与することにより、それらのインドロカルバゾール系化合物に対する感受性を増強するために用いることができる。

また、本発明は、本発明のタンパク質の発現を指標にすることにより、癌患者の化学療法剤に対する耐性を予測する方法に関する。「発現を指標とすること」という表現における「発現」とは、DNAがmRNAに転写され、更にポリペプチド又はタンパク質に翻訳されるいずれのプロセスをも含む。

「タンパク質の発現を指標とする」とは、被検体中に存在する該タンパク質の mRNA 量または該タンパク質（ポリペプチド）自体の量を周囲正常組織のそれや、既知の耐性度が明らかとなっている細胞株におけるそれと比較して、どの程度の量の発現が認められるかを指標にすることを意味する。mRNA 量で比較を行う場合は、具体的には哺乳動物細胞、癌患者の癌細胞、組織標本、組織検体などから一般的な方法で RNA を抽出し、本発明の ABCG2 タンパク質をコードするポリヌクレオチドの部分配列からなる DNA 断片をプローブとし、実施例 4 に示すごとくノーザンハイブリダイゼーションによって測定を行う。或いは、上記の抽出 RNA を、本発明の ABCG2 タンパク質をコードするポリヌクレオチドの配列上にハイブリダイズすることができるプライマーセットを用い、文献 (Noonan, K. E., et. al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1990) 87, 7160 - 4 及び Futscher, B. W., et. al, Anal Biochem (1993) 213, 414 - 21) に準じて RT-PCR を行うことによって、該タンパク質の mRNA 量の測定を行うが、該 mRNA 量の測定方法はこれらに限らない。

また、該タンパク質（ポリペプチド）自体の量で測定および比較を行う場合は、先に述べた「抗体」を用い、文献 (Beck, W. T., et. al, Cancer Res. (1996) 56, 3010 - 20) に準じた方法で哺乳動物細胞、癌患者の癌細胞あるいは組織切片などの免疫組織化学染色法によってコントロールとの比較を行うか、あるいは被検体のタンパク成分を抽出したものについて、一般的な方法でウエスタンブロッティングを行っても良いが、これらの方法に限定されない。

上記および上記以外のいずれの方法によっても、コントロールと比較し被検体において該タンパク質の「過剰発現」が認められた場合、その検体の由来する細胞或いは患者は化学療法剤耐性を有すると判断する。

また、本発明は、本発明の ABCG2 タンパク質の作用に対する阻害剤をスクリーニングする方法をも包含し、これは次の何れかの活性をもつ物質を探索することからなる方法である。（イ）本発明の ABCG2 タンパク質とその基質化合

物の結合を阻害する物質。(ロ) 本発明のABC G 2タンパク質が有するAT P a s e 活性の基質化合物による活性化を阻害する物質。(ハ) 本発明のABC G 2タンパク質による基質化合物の膜輸送を阻害する物質。(ニ) 本発明のABC G 2タンパク質の基質化合物が有する細胞毒性を増強する物質。

(イ) の物質を探索することからなる本発明のスクリーニング方法は、(a) 候補化合物の存在下で本発明のABC G 2タンパク質またはその部分ペプチドに基質化合物を接触させ、該タンパク質またはその部分ペプチドと基質化合物との結合活性を検出する工程、および(b) 工程(a) で検出された結合活性を、該候補化合物非存在下での結合活性と比較し、本発明のABC G 2タンパク質もしくはその部分ペプチドと基質化合物との結合活性を低下させる物質を選択する工程を含む。該候補化合物としては、タンパク質、ペプチド、非ペプチド性化合物、人工的に合成された化合物、組織や細胞の抽出液、血清などが挙げられるが、これらに制限されない。スクリーニングに用いる本発明のABC G 2タンパク質またはその部分ペプチドは精製された状態のみならず、例えば、アフィニティーカラムに結合した形態、該タンパク質もしくはその部分ペプチドを細胞膜に発現した所望の細胞(該タンパク質を発現するように処理した形質転換体を含む)の膜小胞(Leier I. ら、Journal of Biological Chemistry, 269(45):27807-10, 1994の方法に準じて調製できる)、あるいは精製した該タンパク質またはその部分ペプチドをリボソーム上に再構成した形態(Anbudkar, S. V. ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA(1992) 89: 8472 - 8476の方法に準じて調製できる)などであってもよい。スクリーニングに利用する基質化合物は特に限定しないが、好ましくはインドロカルバゾール系化合物、例えば化合物-Aが用いられ、これらは必要に応じて適宜標識して用いられる。標識としては、例えば、放射標識、蛍光標識、光親和性標識などが挙げられるが、これらに制限されない。本発明のヒトABC G 2タンパク質と基質化合物との結合活性は、本発明のABC G 2タンパク質に結合した化合物に付された標識により検出(例えば、結合量を放射活性や蛍光強度により検出する)することができるほか、光親和性標識の場合は文献(Cornwell MM. ら、P

roc. Natl. Acad. Sci. USA. 83:3847-50, 1986)の方法に準じ、該タンパクまたはその部分ペプチドと光親和性標識化合物が共有結合したものをSDSポリアクリルアミドゲル等で分離し、オートラジオグラフィで光親和性標識化合物の放射活性を測定することによって検出することもできる。検出の結果、該候補化合物の存在下における結合活性が、該候補化合物の非存在下における結合活性(対照)より低い値を示した場合には、該候補化合物は、本発明のABCG2タンパク質またはその部分ペプチドと基質化合物との結合を阻害する活性を有すると判定される。

(ロ)の物質を探索することからなる本発明のスクリーニング方法は、(a)候補化合物の存在下で本発明のABCG2タンパク質またはその部分ペプチドに基質化合物を接触させた時に生じるATPase活性を測定する工程、および(b)工程(a)で検出されたATPase活性を、該候補化合物非存在下でのATPase活性と比較し、本発明のABCG2タンパク質が有するATPase活性の基質化合物による活性化を阻害する物質を選択する工程を含む。該候補化合物としては、タンパク質、ペプチド、非ペプチド性化合物、人工的に合成された化合物、組織や細胞の抽出液、血清などが挙げられるが、これらに制限されない。スクリーニングに用いる本発明のABCG2タンパク質またはその部分ペプチドは該タンパク質もしくはその部分ペプチドを細胞膜に発現した所望の細胞(該タンパク質を発現するように処理した形質転換体を含む)の膜小胞、あるいは精製した該タンパク質またはその部分ペプチドをリボソーム上に再構成した形態などであってもよい。スクリーニングに利用する基質化合物は特に限定しないが、好ましくはインドロカルバゾール系化合物、例えば化合物-Aが用いられる。ATPase活性は一般的な方法、例えばATPの加水分解によって生じる無機リン酸の量を比色定量する(Adam B. Shapiroら、Journal of Biological Chemistry. 269:3745-3754, 1994参照)方法などにより測定することができる。該候補化合物の存在下におけるATPase活性が、該候補化合物の非存在下におけるATPase活性(対照)より低い値を示した場合には、該候補化合物は本発明のABCG2タンパク質が有するATPase活性の基質化合物による活性化を阻害す

る活性をもつと判定する。

(ハ) の物質を探索することからなる本発明のスクリーニング方法は、大きく3つの方法に分けられる。

第一の方法は本発明のA B C G 2タンパク質またはその部分ペプチドを細胞膜に発現した所望の細胞（該タンパク質を発現するように処理した形質転換体を含む）の膜小胞、あるいは精製した該タンパク質またはその部分ペプチドをリポソーム上に再構成した小胞を用い、（a）候補化合物の存在下でこれらの小胞に該タンパク質の基質化合物を接触させ、小胞中に輸送された該基質化合物量を測定する工程、および（b）工程（a）で測定された小胞中に輸送された該基質化合物量を、該候補化合物非存在下での輸送された該基質化合物量と比較し、本発明のA B C G 2タンパク質またはその部分ペプチドによる該基質化合物の膜輸送活性を阻害する物質を選択する工程を含む。具体的には、例えばJ. Biol. Chem. 269. 27807-10（1994）の記載に準じた方法によって実施することが可能である。スクリーニングに利用する基質化合物は特に限定しないが、好ましくはインドロカルバゾール系化合物、例えば化合物-Aが用いられ、これらは必要に応じて適宜標識して用いられる。標識としては、例えば、放射標識、蛍光標識などが挙げられ、小胞内に輸送された基質化合物量は、これらの標識により検出（例えば、放射活性や蛍光強度により検出）する。検出の結果、該候補化合物存在下における小胞内の該基質化合物量が、該候補化合物の非存在下における小胞内の該基質化合物量（対照）より低い値を示した場合に、該候補化合物は、本発明のA B C G 2タンパク質またはその部分ペプチドによる該基質化合物の膜輸送活性を阻害する活性を有すると判定される。

第二の方法は本発明のA B C G 2タンパク質またはその部分ペプチドを細胞膜に発現した所望の細胞（該タンパク質を発現するように処理した形質転換体を含む）を用い、（a）候補化合物の存在下これらの細胞に該タンパク質の基質化合物を一定時間接触させたのち、細胞内に蓄積された該基質化合物量を測定する工程、および（b）工程（a）で測定された細胞中に蓄積された該基質化合物量を、該候補化合物非存在下で細胞中に蓄積された該基質化合物量と比較し、本発明のA B C G 2タンパク質もしくはその部分ペプチドによる細胞外への膜輸送（排

出) 活性を低下させる物質を選択する工程を含む。

第三の方法は本発明のABC G 2タンパク質またはその部分ペプチドを細胞膜に発現した所望の細胞(該タンパク質を発現するように処理した形質転換体を含む)を用い、(a) 細胞に該タンパク質の基質化合物を接触させ、細胞内に基質化合物を蓄積させる工程、(b) 候補化合物の存在下、工程(a)で得られた細胞を一定時間培養し細胞内に残留している該基質化合物量を測定する工程、および(c) 工程(b)で測定された細胞内残留該基質化合物量を、該候補化合物非存在下での培養後の細胞内残留該基質化合物量と比較し、本発明のABC G 2タンパク質もしくはその部分ペプチドによる細胞外への膜輸送(排出)活性を低下させる物質を選択する工程を含む。第二、第三の方法は、Bruin, M. ら、Cancer. Let. 146, 117-26 (1999)の記載に準じて実施することが可能である。第二、第三のいずれの方法においても、利用する基質化合物は特に限定しないが、細胞内に透過しなかつ本発明のABC G 2タンパク質によって輸送され得る蛍光物質、あるいはインドロカルバゾール系化合物、例えば化合物-Aが用いられ、これらは必要に応じて適宜標識して用いられる。標識としては、例えば、放射標識、蛍光標識などが挙げられ、細胞内に蓄積又は残留した基質化合物量はこれらの標識により検出(放射標識の場合は放射活性量を測定し、蛍光標識の場合は蛍光強度をフローサイトメトリー、蛍光顕微鏡および蛍光光度計などで測定)することができる。検出の結果、該候補化合物の存在下における該基質化合物の細胞内蓄積又は残留量が、該候補化合物の非存在下における細胞内蓄積量又は残留量(対照)より高い値を示した場合に、該候補化合物は、本発明のABC G 2タンパク質またはその部分ペプチドによる該基質化合物の膜輸送活性を阻害する活性を有すると判定される。また、第一、第二、第三のいずれのスクリーニング方法においても、該候補化合物として、タンパク質、ペプチド、非ペプチド性化合物、人工的に合成された化合物、組織や細胞の抽出液、血清などが挙げられるが、これらに制限されない。

(二)の物質を探索することからなる本発明のスクリーニング方法は、本発明のABC G 2タンパク質またはその部分ペプチドを細胞膜に発現した所望の細胞(該タンパク質を発現するように処理した形質転換体を含む)を用い、(a) 該

細胞を候補化合物の存在下で該タンパク質の基質化合物と一定時間培養し生存細胞数を測定する工程、および（b）工程（a）で測定された生存細胞数を、該候補化合物非存在下で該基質化合物と一定時間培養した場合の生存細胞数と比較し、本発明のA B C G 2タンパク質の該基質化合物が有する細胞毒性効果を増強する物質を選択する工程を含む。該候補化合物としては、タンパク質、ペプチド、非ペプチド性化合物、人工的に合成された化合物、組織や細胞の抽出液、血清などが挙げられるが、これらに制限されない。スクリーニングに利用する基質化合物は特に限定しないが、好ましくはインドロカルバゾール系化合物、例えば化合物-Aなどの細胞毒性効果を有するものが用いられる。生存細胞数の測定は、それらのタンパク質量あるいはミトコンドリアにおける還元酵素の活性の測定などに置き換えられることは当業者であれば公知の事実である。

以上を示したような、本発明のスクリーニング方法によって得られた阻害剤は、薬剤が本発明のA B C G 2タンパク質によって細胞外へ排出されることによって生じる該薬剤に対する耐性を有する細胞や患者に対し、該薬剤への耐性を抑制する、つまり感受性増強剤として有用である。また、これらの化合物は、本発明のA B C G 2タンパク質が関与する細胞膜を通した物質輸送に起因する疾患の治療などのための医薬組成物として有用である。

本発明のスクリーニング方法を用いて得られる阻害剤は、本発明のA B C G 2タンパク質の活性を阻害する化合物であり、具体的には、このA B C G 2タンパク質に高い親和性で結合し、競合的に、または非競合的にこの分子による基質の輸送を阻害するものである。該化合物としては、ペプチド、タンパク、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物などが挙げられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。このような化合物を、このA B C G 2タンパク質を発現している細胞に対してA B C G 2タンパク質の基質となる抗癌剤と同時に投与することにより、この抗癌剤の効果を増強することができる。このような方法は、このA B C G 2タンパク質を発現することにより抗癌剤に対して耐性になったような癌に対して特に有効であり、耐性克服のための医薬品として有効である。

実施例

以下に実施例及び参考例を挙げて本発明をより具体的に説明するが、本発明はこれらによって何ら限定されるものではない。

[実施例 1] 化合物-A 耐性細胞株の樹立：

複数の独立した細胞株から化合物-A 耐性細胞株を樹立するために、以下のようマウス繊維芽細胞株 L Y 細胞、ヒト肺大細胞癌細胞株 P C-1 3 細胞、ヒト大腸癌細胞株 H C T 1 1 6 細胞の合計 3 細胞株を化合物-A 存在下で長期間培養することにより樹立した。

(実施例 1-1) マウス化合物-A 耐性細胞株 L Y / N R 1 細胞株の樹立：

L Y 細胞を初め 0.1 μ M 化合物-A 存在下で 2 週間培養したのち、更に 0.3 μ M 化合物-A 存在下で 3 週間培養した。この条件下で生育してきたコロニーをクローニングリング (旭テクノグラス社) を用いてを単離し、L Y / N R 1 と名づけた。

(実施例 1-2) マウス化合物-A 耐性細胞株 L Y / N R 2 細胞株の樹立：

L Y 細胞を初め 0.1 μ M 化合物-A 存在下で 2 週間培養したのち、更に 0.3 μ M 化合物-A 存在下で 5 週間培養し、生育してきたコロニーを前記同様単離し、L Y / N R 2 と名づけた。

(実施例 1-3) ヒト化合物-A 耐性細胞株 P C-1 3 / N R 1 3 細胞株の樹立：

P C-1 3 細胞を 1.1 μ M の化合物-A 存在下で 5 週間培養して単離された耐性細胞細胞株 P C-1 3 X 1 3 を、さらに 20 μ M の化合物-A 存在下で 4 週間培養し、生育してきたコロニーを単離し、P C-1 3 / N R 1 3 と名づけた。

(実施例 1-4) ヒト化合物-A 耐性細胞株 H C T 1 1 6 / N R 1 細胞株の樹立：

H C T 1 1 6 細胞を 1.1 μ M の化合物-A 存在下で 5 週間培養して単離された耐性細胞細胞株 H C T 1 1 6 X 1 3 を、さらに 20 μ M の化合物-A 存在下で 4 週間培養し、生育してきたコロニーを単離し、H C T 1 1 6 / N R 1 と名づけた。

(実施例 1-5) 化合物-A 自然耐性細胞株の取得：

化合物-Aに自然耐性を示すHeLa細胞（子宮頸癌細胞）から限界希釈法によりシングルクローンを得、HeLa#7細胞株と名づけた。また、同じHeLa細胞から派生したとされる既存のHeLaS3細胞株を化合物-A感受性の細胞としてHeLa#7との比較実験に用いた。

〔実施例2〕化合物-A耐性細胞株の各種抗癌剤に対する薬剤感受性の測定：

樹立された化合物-A耐性細胞株の化合物-A、化合物-Bおよび各種抗癌剤に対する感受性をSRB法を用いて以下のように測定した。

対数増殖期の細胞を 1×10^3 個/wellとなるように96穴プレートに播き、24時間CO₂インキュベータ中で培養後、段階希釈した薬剤を細胞に加えた。さらに72時間培養したのち、細胞をTCAで固定し、細胞中のタンパク質を0.4%スルホローダミン-B溶液で染色した。これを10mMのTris-C1で1時間溶出し、SPECTRAMax 250吸光度計（モレキュラー・デバイス社）にて測定波長560nm、対象波長450nmで測定した。IC₅₀は細胞の増殖を50%阻害する薬剤濃度として定義し、相対耐性度（Relative Resistance）はある薬剤の耐性細胞株に対するIC₅₀値をその薬剤の親細胞株に対するIC₅₀値で除することによって求めた。

この結果ヒト由来の化合物-A耐性細胞株はいずれも化合物-Aと化合物-Bに百倍以上の高度耐性を示した（表1）。またマウス由来のLY/NR1細胞株は化合物-Aに対し12倍、化合物-Bに対し17倍と中程度の耐性を示し、LY/NR2細胞株は化合物-Aに対し64倍、化合物-Bに対し210倍と高度耐性を示した（表2）。

表 1. ヒト化合物-A 耐性細胞株の各種抗癌剤に対する感受性

薬剤	HCT116		HCT116/NR1		PC13		PC13/NR13		HeLaS3		HeLa#7	
	IC50(μ M)	IC50(μ M)	IC50(μ M)	相対耐性度	IC50(μ M)	IC50(μ M)	IC50(μ M)	相対耐性度	IC50(μ M)	IC50(μ M)	IC50(μ M)	相対耐性度
化合物-A	0.13	300	2400		0.23	> 1000	> 4300		0.89	290	330	
化合物-B	0.0034	0.78	230		0.013	1.8	140		0.015	200	13000	
Camptothecin	0.0094	0.017	1.8		0.038	0.029	0.76		0.014	0.038		2.7
Topotecan	0.034	0.14	4.1		0.075	1.1	15		0.063	0.36		5.7
Etoposide	1.1	3.4	3.1		1.2	3.0	2.5		1.2	0.93		0.79
Doxorubicin	0.025	0.059	2.3		0.028	0.070	2.5		0.035	0.029		0.81
Vincristine	0.0020	0.0093	4.7		0.013	0.0070	0.56		0.00070	0.0069		9.9
Paclitaxel	0.0011	0.0021	1.9		0.0020	0.0018	0.92		0.0010	0.0042		4.2
Mitoxantrone	0.0070	0.067	9.6		0.033	0.16	4.9		0.0044	0.027		6.1

表 2. マウス化合物-A耐性細胞株の各種抗癌剤に対する感受性

薬剤	LY	LY/NR1		LY/NR2	
	IC50(μ M)	IC50(μ M)	相対耐性度	IC50(μ M)	相対耐性度
化合物-A	0.12	1.4	12	7.7	64
化合物-B	0.0017	0.029	17	0.36	210
Camptothecin	0.046	0.058	1.3	0.38	8.2
Topotecan	0.069	0.25	1.8	2.9	20
Etoposide	0.28	0.52	2.1	2.0	4.7
Doxorubicin	0.043	0.067	1.6	0.19	4.5
Vincristine	0.015	0.011	0.77	0.025	1.7
Paclitaxel	0.041	0.057	1.4	0.081	2.0
Mitoxantrone	0.0033	0.0071	1.5	0.057	17

[実施例 3]

(実施例 3-1) LY、LY/NR1、LY/NR2 からの RNA の調製:

LY、LY/NR1、LY/NR2 からの RNA の調製は以下の方法で行った。
約 1×10^7 の細胞をトリプシン処理によってはく離、遠心操作によって回収した。その後、細胞を QIAshredder (キアゲン社) によってホモジナイズし、RNeasy (キアゲン社) により Total RNA を調製した。

(実施例 3-2) cRNA の調製:

Total RNA 画分 32μ g にプライマーとして T7-(dT)₂₄ (配列番号: 3/GGCCAGTGAATTGTAATACGACTCACTATAGGGAGGCGG-(dT)₂₄) を加え、SUPERScript II の逆転写酵素 (BRL 社) により、添付バッファーを用いて相補 DNA を合成した。反応後の産物は、大腸菌 DNA Ligase (BRL 社)、大腸菌 DNA Polymerase I (BRL 社)、大腸菌 RNase H (BRL 社) を添加後、添付のバッファーを用いて 2 時間 16℃ で反応を行った後、T4 DNAPolymerase (BRL 社) を添加し 2 本鎖 DNA を合成した。この反応液はフェノール:クロロホルム (1:1) で処理し、エタノール沈殿を行った後、12 μ l の蒸留水に溶解した。cDNA 画分 2.5 μ l に T7 Polymerase (ENZO 社)、ピオチン化した UTP、CTP (ENZO 社) を添加する事によって cRNA を合成し、酸処理によって断片化を行った。

(実施例 3-3) DNA マイクロアレーへのハイブリダイゼーション、洗浄及び

染色：

このcRNA 15 μ gを100mM MES、1M [Na⁺]、20mM EDTA、0.01% Tween 20を含むバッファーに溶解しジーンチップMu11KSubA、SubB、Mu19KSubA、SubB、SubCのDNAマイクロアレー（アフィメトリックス社）に16時間、45℃においてハイブリダイゼーションを行った。DNAマイクロアレーの洗浄はDNAマイクロアレーで定められたフルイディックスステーション（アフィメトリックス社）の条件にしたがって行った。その後各々のDNAマイクロアレーは抗体蛍光増幅法によって染色を行った。まず、DNAマイクロアレーにStreptavidinによって修飾されたPhycoerythrin（モレキュラプローブ社）を加え1次染色を行いその後ヤギIgG（シグマ社）、ビオチン化されたヤギ抗Streptavidin抗体（ベクターラボラトリー社）と反応を行いStreptavidinによって修飾されたPhycoerythrinによって再度染色を行った。

（実施例3-4）DNAマイクロアレーデータの解析：

ハイブリダイゼーション、洗浄及び染色後のDNAマイクロアレーはジーンチップスキャナー（ヒューレットパッカード社）によって蛍光強度の測定を行った。スキャンニングは2度行い、その平均によって結果を画像データとして保存した。発現量の定量化及び比較の解析はジーンチップ発現解析ソフトウェア（アフィメトリックス社）によって画像データの解析をすることによって行った。発現量の比較は上記ソフトウェアのComparison解析によって行いLYとLY/NR2、LYとLY/NR1の発現量を比較して行った。

その結果、発現を解析した約30000種類の遺伝子の中でLYと比較したときに、最もLY/NR2細胞選択的に発現が上昇していたのがABCトランスポーターファミリーのABCG2遺伝子であり、親株のLY細胞に比べ31倍の発現上昇を示した（表3）。各細胞の化合物-A耐性度とこの遺伝子の発現上昇に相関があることが示唆された。

表3. マウス化合物-A耐性細胞において選択的に発現が上昇している遺伝子のDNAチップによる解析

遺伝子名	耐性株における発現上昇 ^a (倍)	
	LY/NR2	LY/NR1
ABCG2	31.2	6.0
af070537 Full Length w/o function	15.5	13.4
ATP Synthetase A chain	6.2	NC ^b
Interferon Activatable protein	5.2	NC
Interferon Activatable protein	4.7	2.3
3-beta hydroxylstroid dehydrogease	4.6	NC
Interferon Activatable Protein	4.5	4.7
EST	4.5	NC
Y13275, Meta-associ tetraspan molecule	4.3	3.8
19kD Glycoprotein Autoantigen	4.2	3.2
Lipocortin, x07486	4.1	NC
Ig heavy chain precursor	4.0	NC
Y-box transcription factor	4.0	-1.6

a LY/NR2 とLY細胞の比較において、LY/NR2で4倍以上発現上昇が見られた遺伝子について、その発現上昇の高いものから順に表記した。またそれらの遺伝子のうち、LY/NR1において発現量に変化がみられた遺伝子に関して、そのLY細胞に対する発現上昇の価をLY/NR1のカラムに記した。

b 親株と比較して発現量に変化が無い遺伝子に関して、NCと表記した。

[実施例4] ノーザンプロット解析：

DNAマイクロアレーによって検出されたABCG2のLY/NR1、LY/NR2耐性細胞株選択的発現を確認するためにマウスABCG2のcDNA断片をプローブとして、またヒト由来化合物-A耐性細胞におけるヒトABCG2の発現を検出するために、本発明のヒトABCG2のcDNA断片をプローブとしてノーザン解析を行った。

(実施例4-1) プロットの作成：

LY、LY/NR1、LY/NR2、HeLaS3、HeLa#7、HCT116、HCT116/NR1、PC-13、及びPC-13/NR1細胞からISOGEN試薬（ニッポンジーン社）を用いグアニジンイソチオシアネート法により Total RNAを調製した。続いて得られたTotal RNAからファストトラック2.0キット（インビトロジェン社）を用いてポリ(A)+R

NAを精製した。得られた各細胞由来のポリ(A)+RNA 0.8 μ gをホルムアルデヒドアガロース変性ゲルで泳動した。泳動後、ゲルからHybond N+メンブレン(アマシャム・ファルマシア社)に20×SSCバッファーを介して一晩転写した。転写後、メンブレンを風乾したのちメンブレン上の核酸をSTRATALINKER(ストラタジーン社)にてUV固定した。

(実施例4-2) プローブの調製とハイブリダイゼーション:

マウスABCG2の検出においては、プローブとして用いるマウスABCG2のcDNA断片を得るために以下の操作を行った。実施例3で調製されたLY/NR2のcDNA 2 μ lを鋳型として使用し、マウスABCG2のDNA配列をもとに合成した上流DNAプライマー(配列番号: 4/CTCATTTAA AACTTGCTCGGGAACC)と下流DNAプライマー(配列番号: 5/CAAGAGGCCAGAAAAGAGCATCATAA)を用いてPCRによる増幅を行った。反応液の組成は、合成DNAプライマー各200 nM、0.1 mM dNTPs、Ex Taq DNA polymerase(宝酒造株式会社) 0.5 μ lおよび酵素に付属のバッファー5 μ lで、総反応溶液量は50 μ lとした。増幅のためのサイクルはサーマルサイクラー(パーキン・エルマー社)を用い、95℃・30秒、60℃・1分、70℃・2分のサイクルを29回繰り返した。次に、得られた増幅産物を希釈した後に、この増幅産物の配列にアニールする上流DNAプライマー(配列番号: 6/TACTGGGGCTTATTATTGGTG)と下流DNAプライマー(配列番号: 7/AAAAGCGATTGTCATGAGAAGTGT)を用いてさらにPCRによる増幅を行った。増幅のためのサイクルは95℃・30秒、62℃・30秒、72℃・2分のサイクルを35回繰り返した。増幅産物の確認は1%アガロースゲル電気泳動およびエチジウムブロミド染色によって行った。このマウスABCG2 cDNA断片をキアクイックPCRピュリフィケーションキット(キアゲン社)で精製の後、マルチプライム・ラベリングキット(アマシャム・ファルマシア社)を用いて[α -³²P] dCTPで標識し、プローブとした。

一方、ヒトABCG2の検出においては実施例5に示した本発明のヒトABCG2全長cDNAを含むプラスミドを鋳型に、上流DNAプライマー(配列番号:

8/CAAAAAGCTTAAGACCGAGCTCTATTAAGC)と下流DNAプライマー(配列番号:9/ATCCTCTAGACCAGGTTTCA TGATCCCATTTG)を用いてPCRによる増幅後、マウスの場合と同様の方法で標識し、プローブとした。これら各々のプローブとサケ精子DNA 1mgをQuickHyb ハイブリダイゼーション・ソリューション(ストラタジーン社)中で65℃、30分プレハイブリダイズさせたメンブレンに添加し、65℃、一時間ハイブリダイゼーションを行った。その後、0.1% SDSを含む2×SSCで室温30分、0.1% SDSを含む0.1×SSCで室温で15分洗浄を行った後、最終的に0.1% SDSを含む0.1×SSCで65℃10分洗浄を行った。洗浄したメンブレンの放射活性をBAS 5000イメージアナライザー(富士写真フイルム)で測定、画像化した。また、各サンプルRNAがほぼ等量泳動されていることを示すために、各プロットをさらにGAPDH(グリセルアルデヒド3リン酸デヒドロゲナーゼ)プローブでハイブリダイズした。即ち、ABCG2プローブをハイブリダイズしたメンブレンを沸騰させた0.5% SDS溶液中に1分浸しそのまま室温まで放置することによりメンブレン上のプローブを剥がした。この後、ヒトGAPDH断片をプローブとして、ABCG2プローブの時と同じ条件でハイブリダイゼーション及び洗浄を行い、測定を行った。

この結果、まずマウスLY、LY/NR1、LY/NR2細胞ではDNAチップの解析で見られたように、耐性度の上昇と相関するようなABCG2の発現上昇が認められた。また、HCT116/NR1、PC-13/NR13、HeLa #7の全てのヒト化合物-A耐性株でABCG2遺伝子が選択的に過剰発現しているのが認められ、本発明の遺伝子が化合物-A及び化合物-B耐性に関与しているのが強く示唆された[図1]。

[実施例5] HeLa #7細胞からのヒトABCG2全長cDNAの単離:

(実施例5-1) 既存のABCG2配列をもとにした合成DNAプライマー配列の作製:

ABCPのmRNAとして報告されている配列(Genbank: AF103796)をもとに開始コドンと終始コドンをはさむようにPCR用の合成DNAプライマー配列を作製した。

5' プライマー (配列番号: 8 / C A A A A A G C T T A A G A C C G A G C T C T A T T A A G C)

3' プライマー (配列番号: 10 / G A A T T A A G G G G A A A T T T A A G A A T)

5' プライマーはA B C Pの配列に加えて5' 末端に制限酵素H i n d I I I による切断に必要な配列を8塩基付加した。

(実施例5-2) H e L a # 7細胞からのT o t a l RNA画分の調製およびc D N Aの合成:

ヒト培養細胞株H e L a # 7細胞よりI S O G E N試薬 (ニッポンジーン社) を用いグアニジンイソチオシアネート法により T o t a l RNAを調製した。次にT o t a l RNA画分2. 5 μ gにプライマーとして18塩基長のo l i g o d Tを加え、S U P E R S C R I P T I Iの逆転写酵素 (B R L社) により、添付バッファーを用いて相補DNAを合成した。

(実施例5-3) H e L a # 7細胞由来c D N Aを用いたP C R法によるA B C G 2遺伝子の増幅と塩基配列の決定:

実施例5-2でH e L a # 7細胞より調製したc D N A 1 μ l (125 n g) を鋳型として使用し、合成DNAプライマーを用いてP C Rによる増幅を行った。反応液の組成は、合成DNAプライマー (配列番号: 8および配列番号: 10) 各300 nM、0. 2 mM d N T P s、L A T a q D N A p o l y m e r a s e (宝酒造株式会社) 2 μ lおよび酵素に付属のバッファー5 μ lで、総反応溶液量は50 μ lとした。増幅のためのサイクルはサーマルサイクラー (パーキン・エルマー社) を用い、94℃・30秒、55℃・1分、72℃・4分のサイクルを30回繰り返した。増幅産物の確認は1%アガロースゲル電気泳動およびエチジウムブロミド染色によって行った。

(実施例5-4) P C R産物のプラスミドベクターへのサブクローニングおよび挿入c D N A部分の塩基配列の決定:

実施例2で行ったP C R後の反応産物は1%のアガロースゲルを用いて分離し、バンドの部分のカミソリで切り出した後、Q I A q u i c k G e l E x t r a c t i o n K i t (キアゲン社) を用いてDNAを回収した。回収したDN

AはrTaq DNA polymeraseにより3'末端にAを付加した後、Eukaryotic TOPO TAクローニングキット（インビトロジェン社）の処方に従い、プラスミドベクターp cDNA3.1/V5-His-TOPOへサブクローニングした。これを大腸菌TOP10 competent cell（インビトロジェン社）に導入して形質転換したのち、cDNA挿入断片を持つクローンをアンピシリンを含むLB寒天培地中で選択した。出現したコロニーを滅菌した妻楊枝を用いて分離し、個々のクローンについてプラスミドベクターのマルチクローニングサイトをはさむプライマーセットによるPCRを行い、予想される大きさのPCR産物が挿入されたクローンを選択した。目的とするPCR産物が挿入されたクローンをアンピシリンを含むLB培地で一晚培養し、QIAprep 8 Turbo miniprep kit（キアゲン社）を用いてプラスミドDNAを調製した。塩基配列の決定のための反応は Dye Deoxy Terminator Cycle Sequencing Kit（ABI社）を用いて行い、蛍光式自動シーケンサーを用いて解読した。

これらの結果、HeLa #7細胞より単離したABCG2の完全長cDNAの配列はこれまでに報告されたものとほぼ一致したが、幾つかの重要な違いが認められた。

本発明のヒトABCG2の塩基配列を配列番号：1に示し、この完全長cDNAをクローニングした大腸菌株（「E. coli HELabcg2」と表記）を、下記の通り寄託した。

(イ) 寄託機関の名称・あて名

名称：独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター（旧通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所）

あて名：日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6（郵便番号305-8566）

(ロ) 寄託日（原寄託日）：平成12年9月25日

(ハ) 寄託番号：生命研菌寄託第18053号（FERM P-18053）

(ニ) 国際寄託への移管日：平成13年9月5日

(ホ) 国際寄託についての受託番号：FERM BP-7726

これまで全長の配列が報告されているABC G 2 遺伝子は2種類で、ABC P として報告されたものとBCRPとして報告されたものがあるが、その中で両者の配列に違いが見られる。その違いは、アミノ酸置換を伴うものに限定すると、24番目のアミノ酸をコードする部分(ABC Pはバリン、BCRPはアラニンをコード)、166番目のアミノ酸をコードする部分(BCRPはグルタミン、ABC Pはグルタミン酸をコード)、208番目のアミノ酸をコードする部分(BCRPはフェニルアラニン、ABC Pはセリンをコード)、482番目のアミノ酸をコードする部分(BCRPはスレオニン、ABC Pはアルギニンをコード)である。

本発明者等の得た配列は、24番目、166番目、208番目のアミノ酸をコードする部分についてはBCRPと同じ、即ち、それぞれアラニン、グルタミン、フェニルアラニンをコードし、逆に482番目のアミノ酸をコードする部分についてのみABC Pと同じアルギニンをコードしているというものであった。言い換えると、本発明者等の得た配列はBCRPとして報告されている配列と482番目のアミノ酸について一アミノ酸異なる配列である。

[実施例6] ヒト正常組織由来cDNAを用いたPCR法によるABC G 2 遺伝子cDNAの増幅と塩基配列の決定：

HeLa #7細胞から得られたABC G 2 遺伝子の配列がABC PあるいはBCRPの配列と異なる部分について、ヒト正常組織由来のABC G 2 cDNAの配列を直接塩基配列決定法によって決定した。

Human MTC™ Panel I (クローンテック社)に含まれる胎盤および腎臓由来のcDNA 2.5 μl (~0.5 ng)を鋳型として使用し、合成DNAプライマー(配列番号：8/CAAAAAGCTTAAGACCGAGCTCTATTAAGC、配列番号：11/AGAGATCGATGCCCTGCTTTACCA)を用いてPCRによる増幅を行った。反応液の組成は、合成DNAプライマー(配列番号：8および配列番号：11)各200 nM、0.4 mM dNTPs、LA Taq DNA polymerase 0.5 μl および酵素に付属のバッファー5 μlで、総反応溶液量は50 μlとした。増幅のためのサイクルはサーマルサイクラー(パーキン・エルマー社)を用い、94℃・

1分の処理後、94℃・30秒、55℃・1分、72℃・3分のサイクルを35回繰り返した。増幅産物の確認は1%アガロースゲル電気泳動およびエチジウムブロミド染色によって行った。PCR産物はQIAquick PCR Purification Kit（キアゲン社）を用いて精製した後、直接塩基配列の決定に用いた。塩基配列の決定のための反応は（実施例5-4）と同様に DyeDeoxy Terminator Cycle Sequencing Kit（ABI社）を用いて行い、蛍光式自動シーケンサーを用いて解読した。

これらの結果、ヒト胎盤および腎臓由来のABCG2 cDNAにおいて、24番目、166番目、208番目及び482番目アミノ酸をコードする部分について、それぞれ、アラニン、グルタミン、フェニルアラニン、アルギニンをコードしていることが明かとなり、本発明者等がHeLa#7細胞から得た配列と同じ配列がヒト正常組織においても発現していることが示唆された。

[実施例7] ヒトABCG2発現細胞の作製：

実施例5に示したように、HeLa#7細胞から得たヒトABCG2の全長cDNAを動物細胞発現用プラスミドp cDNA3.1/V5-His-TOPO（インビトロジェン社）へ組み込んだ。このABCG2発現プラスミドをPC-13細胞にエフェクテン・トランスフェクション・リエージェント（キアゲン社）を用いて遺伝子導入した。実験操作は添付のマニュアルに従った。また対照として、ABCG2配列を含まないベクターのみの導入も行い、以後平行して実験を行った。トランスフェクション操作の2日後にジェネティシン（GIBCO BRL社）0.2mg/mlを含む選択培地と交換し、以後この条件で長期間培養することにより、プラスミドが導入された安定形質導入細胞株を選抜した。導入2週間後に出現してきたコロニーを単離し、ノーザンブロット解析によりABCG2の発現を調べた。ABCG2を高レベルで発現しているクローンPC-13/ABCG2-2、PC-13/ABCG2-3等の数種類を選び、以後の解析に用いた。ノーザンブロットは、各細胞からRNeasy mini kit（キアゲン社）により調製したtotal RNA 8μgを実施例4と同様にホルムアルデヒドアガロース変性ゲルで分離した後、本発明のヒトABCG2のcDNA断片をプローブとして解析を行った。

この結果、クローンPC-13/ABCG2-2とPC-13/ABCG2-3において本発明のABCG2の転写産物の高発現が認められ、その発現量はクローンPC-13/ABCG2-2において耐性細胞株PC-13/NR13の約35%、クローンPC-13/ABCG2-3において、耐性細胞株PC-13/NR13の約20%であった[図2]。

[実施例8] ヒトABCG2発現細胞の各種化学療法剤に対する感受性の測定：

PC-13細胞にABCG2発現プラスミドを導入した安定形質発現細胞の薬剤感受性を実施例2に記載したSRB法で行った。

この結果、ベクターのみを導入したPC-13細胞はこの2つの化合物に対して耐性を示さなかった。これに対し、導入ABCG2の発現量の最も高かったクローンであるPC-13/ABCG2-2は、ベクターのみを導入したPC-13細胞に比べ化合物-Aに対し2.2倍、化合物-Bに対し1.7倍の耐性度を示し、また、次に発現量の高かったクローンPC-13/ABCG2-3はベクターのみを導入したPC-13細胞に比べ化合物-Aに対し9倍、化合物-Bに対し11.7倍の耐性度を示し、ABCG2の過剰発現によってこれらインドロカルバゾール系化合物に耐性が付与されることが強く示唆された。また、これらのABCG2を導入したPC-13細胞株は他の薬剤、すなわちカンプトテシン、トポテカン、ミトキサントロン、エトポシドには顕著な耐性を示さなかった(表4)。ミトキサントロンに対するPC-13/ABCG2-2とPC-13/ABCG2-3の耐性度はそれぞれ0.42倍と、0.60倍であり、これはBCRPをMCF-7に導入発現したときに約30倍耐性になるという報告(Doyl e, A. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 95, 15665-15670 (1998))とは大きく異なるものである。

表4. ABCG2発現ベクターを導入したPC-13細胞株の薬剤感受性

薬剤	PC-13/ベクター		PC-13/ABCG2-2		PC-13/ABCG2-3	
	IC50 (μ M)	IC50 (μ M)	IC50 (μ M)	相対耐性度	IC50 (μ M)	相対耐性度
化合物-A	0.30 \pm 0.12	6.60 \pm 2.6	22.0	2.7 \pm 1.0	9.0	
化合物-B	0.012 \pm 0.004	0.20 \pm 0.03	17	0.14 \pm 0.01	11.7	
Camptothecin	0.043 \pm 0.011	0.029 \pm 0.005	0.67	0.052 \pm 0.008	1.2	
Mitoxantrone	0.052 \pm 0.021	0.022 \pm 0.008	0.42	0.031 \pm 0.018	0.60	
Topotecan	0.21 \pm 0.040	0.19 \pm 0.05	0.90	0.096 \pm 0.022	0.46	
Etoposide	1.0 \pm 0.29	0.46 \pm 0.075	0.46	1.1 \pm 0.33	1.1	

各データは3回の独立した実験の平均値 \pm 標準誤差で示した。
 PC-13/ABCG2-2, PC-13/ABCG2-3の相対耐性度はそれぞれの細胞におけるIC50値をベクター細胞のIC50値で除して得た。

[実施例 9] 本発明の ABCG2 発現細胞内でのインドロカルバゾール系化合物の蓄積の解析：

PC-13 細胞に ABCG2 発現プラスミドを導入した安定形質発現細胞における化合物-B の細胞内蓄積量を以下の方法で測定した。

まず、細胞を 25 cm^2 培養フラスコに 1.5×10^6 個を播き込み一晚培養した。翌日に $50\text{ }\mu\text{M}$ の $[^{14}\text{C}]$ 化合物-B を含む培地と交換し、 37°C 、 CO_2 インキュベーター中で 120 分培養し、ラベル体を細胞中に取り込ませた。120 分経過後細胞を直ちに氷上に起き、PBS で細胞を洗浄した後に 2.5% トリプシンで細胞を剥離し $400 \times g$ 、 4°C で 3 分遠心して細胞を回収した。再度細胞を PBS に懸濁し、細胞数を計測した後に同じ条件で遠心して細胞を再び回収した。この細胞を Triton X-100 に溶解させ、 $2000 \times g$ 、 4°C で 15 分遠心して膜及び細胞質画分を上清として回収し、沈殿した核画分を 0.2 N の NaOH に溶解した。得られた上清サンプルと核画分サンプルそれぞれにクリアゾール I (半井化学社) を加えて液体シンチレーション測定機、TRICARB 2300 (パッカード社) で測定し、上清サンプルと核画分サンプルの値を合計したものを細胞内蓄積量とした [図 3]。

この解析の結果、ABCG2 発現プラスミドを導入した PC-13/ABCG2-2 細胞における化合物-B の蓄積量は化合物-A 耐性細胞 PC-13/NR13 株とほぼ同様の値を示し、ベクターのみを導入した細胞の約 $1/4$ であった。この結果から本発明者等が得た配列をもつ ABCG2 が発現している細胞において化合物-B の蓄積が顕著に低下していた。これにより本願遺伝子によるインドロカルバゾール系化合物の排出が強く示唆された。

[実施例 10] 塩基置換導入による ABCG2-482T 配列の作製：

482 番目のコドンがアルギニンをコードする本発明の ABCG2 (配列番号：1) と、前述の Doyle 等の報告による 482 番目のコドンがスレオニンをコードする BCRP として報告されているものとの活性の違いを明らかにするために、実施例 5 にてクローニングされた ABCG2 遺伝子の cDNA 配列をもとに、以下のように 1 塩基置換を導入して BCRP 型の全長 ABCG2・cDNA を作成し ABCG2-482T とした (配列番号：12)。なお、この配列は

アミノ酸配列に関してはBCRPとして登録されているものと同じであるが、塩基配列に関して、アミノ酸置換を伴わない1塩基の違いがもう一カ所存在する。

(実施例10-1) ABCG2-482T配列に変換するための塩基置換を導入した合成DNAプライマー配列の作製：

まず、本発明のABCG2遺伝子のcDNA配列をもとに、ABCG2の482番目のコドンの塩基配列をBCRPとして報告されている塩基配列の相同部分に置き換えた配列を持ち、ABCG2・cDNAの相補的なそれぞれの鎖にアニールする2つのPCR用DNAプライマーを合成した[図4-(a)参照]。なおそれぞれのプライマー配列中の小文字は、置換を導入した塩基を示す。

5' プライマー (配列番号：14/CCATGA_cGATGTTACCAAGTATT)

3' プライマー (配列番号：15/AACATC_gTCATGGGTAATAAATC)

(実施例10-2) 2段階のPCRによる塩基置換の導入：

次に、実施例5にて作製したABCG2遺伝子cDNAをもつプラスミドを鋳型とし、変異を導入する部分を含めた上流側のcDNA断片と、下流側のcDNA断片をそれぞれPCRにて作製した。

上流側のcDNA断片は5' プライマー (配列番号：16/CATTCATCAGCCTCGATATTCCA) と実施例10-1にて作製した3' プライマー (配列番号：15/AACATC_gTCATGGGTAATAAATC) を用いてPCR増幅した。下流側のcDNA断片は実施例10-1にて作製した5' プライマー (配列番号：14/CCATGA_cGATGTTACCAAGTATT) と3' プライマー (配列番号：17/ACCACACTCTGACCTGCTGCTA) を用いてPCR増幅した[図4-(b)、1st. PCR]。

さらに、これら2つのcDNA断片を連結するために、2つのcDNAを混合し、5' プライマー (配列番号：16/CATTCATCAGCCTCGATATTCCA) と、3' プライマー (配列番号：17/ACCACACTCTGACCTGCTGCTA) を用いてPCRによる増幅を行い[図4-(b)、2nd. PCR]、塩基置換部分を内部に含むPCR産物を得た。PCR後の反応産

物は1%のアガロースゲルを用いて分離し、バンドの部分をカミソリで切り出した後、QIAquick Gel Extraction Kit (キアゲン社)を用いてDNAを回収した。回収したDNAはrTaq DNA polymeraseにより3'末端にAを付加した後、TOPO TAクローニングキット(インビトロゲン社)の処方に従い、プラスミドベクターpCR2.1-TOPOへサブクローニングした。これを大腸菌TOP10 competent cell (インビトロゲン社)に導入して形質転換したのち、cDNA挿入断片を持つクローンをアンピシリンを含むLB寒天培地中で選択した。出現したコロニーを滅菌した爪楊枝を用いて分離し、個々のクローンについてプラスミドベクターのマルチクローニングサイトをはさむプライマーセットによるPCRを行い、予想される大きさのPCR産物が挿入されたクローンを選択した。目的とするPCR産物が挿入されたクローンをアンピシリンを含むLB培地で一晚培養し、QIAprep 8 Turbo miniprep kit (キアゲン社)を用いてプラスミドDNAを調製した。塩基配列の決定のための反応はDyeDeoxy Terminator Cycle Sequencing Kit (ABI社)を用いて行い、蛍光式自動シーケンサーを用いて解読して塩基置換が導入されていることを確認した。

(実施例10-3) 全長ABCG2-482T・cDNAの作成とその動物発現プラスミドへの組み込み:

実施例10-2にて作製した塩基置換を導入したcDNA断片をその内部を切断する二つの制限酵素、Pvu II、Nco Iを用いて切断し、塩基置換を導入した領域を含む断片を切り出した。この断片を、実施例5にてクローニングしたABCG2遺伝子cDNAをPvu II、Nco Iを用いて切断したものと連結することによって、コドン482部分を含む領域が、変異の導入された断片と置き換わったABCG2遺伝子の全長cDNAが得られ、これをABCG2-482Tとした。

このABCG2-482T cDNAをプラスミドベクターpcDNA3.1/Myc-Hisに挿入し、動物細胞発現プラスミドを作製した。これを大腸菌TOP10 competent cell (インビトロゲン社)に導入して形質

転換したのち、cDNA挿入断片を持つクローンをアンピシリンを含むLB寒天培地中で選択した。出現したコロニーを滅菌した爪楊枝を用いて分離し、個々のクローンについてプラスミドベクターのマルチクローニングサイトをはさむプライマーセットによるPCRを行い、予想される大きさのPCR産物が挿入されたクローンを選択した。目的とするPCR産物が挿入されたクローンをアンピシリンを含むLB培地で一晚培養し、QIAprep 8 Turbo miniprep kit (キアゲン社)を用いてプラスミドDNAを調製した。塩基配列の決定のための反応は DyeDeoxy Terminator Cycle Sequencing Kit (ABI社)を用いて行い、蛍光式自動シーケンサーを用いて解読しABCG2-482Tの配列であることを確認した。

〔実施例11〕本発明のABCG2若しくはABCG2-482Tを発現するMCF-7細胞の作成：

実施例5で調製した本発明のヒトABCG2の全長cDNA、若しくは実施例10で調製したABCG2-482T cDNAをそれぞれ組み込んだ動物細胞発現プラスミドをヒト乳癌細胞であるMCF-7細胞にエフェクテン・トランスフェクション・リエージェント (キアゲン社)を用いて遺伝子導入した。実験操作は添付のマニュアルに従った。また対照として、ABCG2配列を含まないベクターのみの導入も行い、以後平行して実験を行った。トランスフェクション操作の2日後にジェネティシン (GIBCO BRL社) 900 μ g/mlを含む選択培地と交換し、以後この条件で長期間培養することにより、プラスミドが導入された安定形質導入細胞株を選抜した。導入2～3週間後に出現してきたコロニーを単離し、ノーザンブロット解析によりABCG2の発現を調べた。ノーザンブロットは、各細胞からRNeasy mini kit (キアゲン社)により調製したtotal RNA 8 μ gを実施例4と同様にホルムアルデヒドアガロース変性ゲルで分離した後、本発明のヒトABCG2のcDNA断片をプローブとして解析を行った。

その結果、本発明のABCG2を導入した細胞クローンからはMCF-7/R7が、アミノ酸置換体であるABCG2-482Tを導入した細胞クローンからはMCF-7/T8がそれぞれ導入遺伝子を高レベルで発現しており、以後これ

らを解析に用いた。またこの2つの細胞株におけるABC G 2発現量はほぼ同程度であった(図5)。

〔実施例12〕本発明のABC G 2若しくはABC G 2-482 Tを発現するMCF-7細胞の各種化学療法剤に対する感受性の測定：

MCF-7細胞に、ABC G 2発現プラスミド若しくはABC G 2-482 T発現プラスミドを導入した安定形質発現細胞の薬剤感受性を実施例2に記載したSRB法で測定し、各導入細胞株の薬剤に対する感受性を、ベクターのみの導入細胞株に対する相対耐性度として表した〔図6〕。

この結果、ABC G 2-482 Tを導入したMCF-7/T8は化合物-Bに対して12倍の耐性を示した以外に、ミトキサントロン、アドリアマイシン及びダウノルビシンにそれぞれ、25倍、9.6倍、5.1倍と、種々の化合物に対して耐性を示した。即ち、以前にBCRPとして報告された通り、482番目のコドンがスレオニンをコードするタイプの遺伝子が発現させた細胞は、インドロカルバゾールの他に、様々な化合物に対して耐性を示す多剤耐性因子的な性質を持つことが示された。

これに対し、本発明のABC G 2を導入したMCF-7/R7は、化合物-Bに22倍と高い耐性を示した以外には、ミトキサントロンに対してわずか3.8倍の耐性を示すのみで、アドリアマイシン及びダウノルビシンに対しては全く耐性にならなかった。即ち、482番目のコドンがアルギニンをコードしている本発明のABC G 2発現細胞は化合物-Bに選択的に耐性となることが示された。

以上よりBCRPとして報告されていたタイプのABC G 2が広い範囲の化学療法剤に対し耐性を与えるのに対し、それと一アミノ酸異なる本発明のABC G 2がインドロカルバゾール選択的な耐性を付与することが示された。

〔実施例13〕本発明のABC G 2若しくはABC G 2-482 Tを発現するMCF-7細胞におけるインドロカルバゾール系化合物の蓄積の解析：

MCF-7細胞に本発明のABC G 2、若しくはABC G 2-482 Tを導入した安定形質発現細胞における化合物-Bの細胞内蓄積量を以下の方法で測定した。

まず、6ウェル培養プレートに細胞を 8×10^5 個/well播き込み一晚培

養した。翌日に7 μ Mの $[^{14}\text{C}]$ 化合物-Bを含む培地と交換し、37℃、CO₂インキュベーター中で180分培養し、ラベル体を細胞中に取り込ませた。180分経過後細胞を直ちに氷上に起き、PBSで細胞を3回洗浄した後に、この細胞に2NのNaOHを加え、40℃で60分震盪して溶解させた。得られたサンプルの一部をブラッドフォード法にてタンパク定量をし、溶液のタンパク濃度を求めた。残りのサンプルにハイオニックフロー（パッカード社）を加えて液体シンチレーション測定機、TRICARB 2500（パッカード社）で測定し、細胞内蓄積量とした〔図7-（a）〕。

この解析の結果、ABCG2-482Tを導入したMCF-7/T8と、本発明のABCG2を導入したMCF-7/R7において化合物-Bの蓄積量は共に低下していた。これにより、ABCG2-482Tを導入した細胞でも、本願遺伝子を導入した細胞においても、インドロカルバゾール系化合物を能動的に排出していることが証明された。

〔実施例14〕本発明のABCG2若しくはABCG2-482Tを発現するMCF-7細胞におけるミトキサントロン、及びローダミンの蓄積の解析：

MCF-7細胞に本発明のABCG2、若しくはABCG2-482Tを導入した安定形質発現細胞におけるミトキサントロンの細胞内蓄積量を以下の方法で測定した。

まず、6ウェル培養プレートに細胞を 1.0×10^6 個/well播き込み一晚培養した。翌日に20 μ Mのミトキサントロンを含む培地と交換し、37℃、CO₂インキュベーター中で90分培養し、化合物を細胞中に取り込ませた。90分経過後細胞を直ちに氷上に起き、PBSで細胞を1回洗浄した後に、2.5%トリプシンで細胞を剥離し400×g、4℃で3分遠心して細胞を回収した。細胞を1%BSAを含むHank's Balanced Salt Solutionsに懸濁し、フローサイトメーター、Epics Elite（コールター社）で化合物の蛍光量を測定し、細胞内蓄積量とした〔図7-（b）〕。

また、MCF-7細胞に本発明のABCG2、及びABCG2-482Tを導入した安定形質発現細胞におけるローダミンの細胞内蓄積量は以下の方法で測定した。

まず、6ウェル培養プレートに細胞を 1.0×10^6 個/well播き込み一晚培養した。翌日に $5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ のローダミンを含む培地と交換し、 37°C 、 CO_2 インキュベーター中で30分培養し、化合物を細胞中に取り込ませた。30分経過後細胞を直ちに氷上に起き、PBSで細胞を1回洗浄した後に、2.5%トリプシンで細胞を剥離し $400 \times g$ 、 4°C で3分遠心して細胞を回収した。細胞を1%BSAを含むHank's Balanced Salt Solutionsに懸濁し、フローサイトメーター、Facs Calibur（ベクτονディッキンソン社）で化合物の蛍光量を測定し、細胞内蓄積量とした〔図7-(c)〕

この解析の結果、MCF-7/T8細胞では、ミトキサントロンの蓄積量がベクターのみを導入した細胞の約20%程度にまで減少し、ミトキサントロンが強く排出されているが、MCF-7/R7細胞においては、約50%程度までしか減少しておらず、それほど排出されていないことが明らかになった。また、MCF-7/T8細胞のローダミンの蓄積量は、ベクターのみを導入した細胞の約50%にまで減少するが、MCF-7/R7細胞では、ベクターのみを導入した細胞と同程度の蓄積量であり、ローダミンは全く排出されないことが明らかになった。

以上のことから、本発明のABCG2とABCG2-482Tは、1アミノ酸異なることにより基質選択性が異なることが示された。

産業上の利用の可能性

本発明により、インドロカルバゾール系化合物を選択的に細胞外へ輸送するタンパク質及びその遺伝子が提供された。これにより該輸送体タンパク質およびそれをコードする遺伝子を利用した阻害剤のスクリーニングやどのような抗癌剤が投与するのに適当かを判断することが可能となった。さらに、得られる阻害剤を使用すれば、癌細胞の感受性を増強出来るので治療への利用が期待出来る。

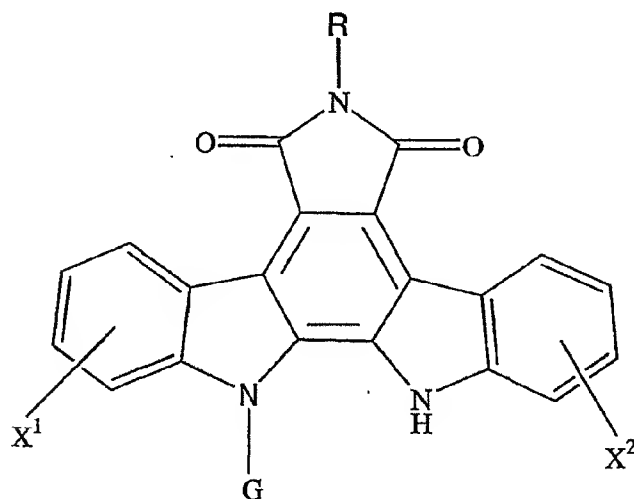
請求の範囲

1. 下記（A）または（B）に記載のアミノ酸配列からなり、かつ哺乳動物細胞に癌化学療法剤耐性を付与するタンパク質：

（A）配列番号：2 記載のアミノ酸配列。

（B）配列番号：2 記載のアミノ酸配列において1もしくは複数のアミノ酸が置換、欠失若しくは付加したアミノ酸配列。

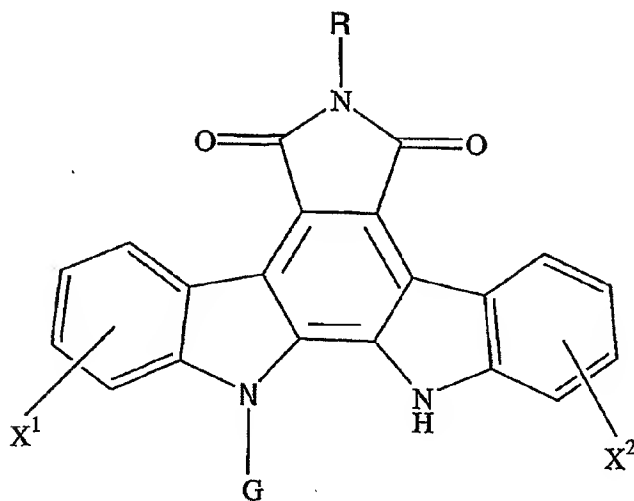
2. 前記癌化学療法剤が、下記一般式（I）で表される化合物であることを特徴とする請求の範囲1に記載のタンパク質：



(I)

式中、X¹およびX²はそれぞれ独立に水素原子、ハロゲン原子、又はヒドロキシ基を示し、Rは水素原子、アミノ基、ホルミルアミノ基、又は1ないし3個のヒドロキシ基、置換基を有していてもよいピリジル基および置換基を有していてもよいチエニル基からなる群から選ばれる置換基によって置換されてもよい低級アルキルアミノ基であり、Gは五炭糖基、六炭糖基、又はアミノ基によって置換を有されてもよい五炭糖基若しくは六炭糖基を示す。

3. 請求の範囲 1 または 2 に記載のタンパク質の部分ペプチド。
4. 請求の範囲 1 から 3 のいずれかに記載のタンパク質もしくは部分ペプチドをコードするポリヌクレオチド、または該ポリヌクレオチドに相補的な配列からなるポリヌクレオチド。
5. 前記ポリヌクレオチドの DNA 配列が、配列番号：1 に表される DNA 配列のコード領域またはその相補的な配列の、少なくとも一部分からなることを特徴とする請求の範囲 4 に記載のポリヌクレオチド。
6. 下記一般式 (I) で表される化合物に対する耐性を有する哺乳動物細胞を検出するために用いることを特徴とする請求の範囲 4 または 5 に記載のポリヌクレオチド：



(I)

式中、 X^1 および X^2 はそれぞれ独立に水素原子、ハロゲン原子、又はヒドロキシ基を示し、 R は水素原子、アミノ基、ホルミルアミノ基、又は1ないし3個のヒドロキシ基、置換基を有していてもよいピリジル基および置換基を有していてもよいチエニル基からなる群から選ばれる置換基によって置換されてもよい低級アルキルアミノ基であり、 G は五炭糖基、六炭糖基、又はアミノ基によって置換を

有されてもよい五炭糖基若しくは六炭糖基を示す。

7. 配列番号：1で表されるDNA配列において1489番目の塩基（G）を含む15～100の連続したDNA配列またはその相補的な配列からなるポリヌクレオチド。

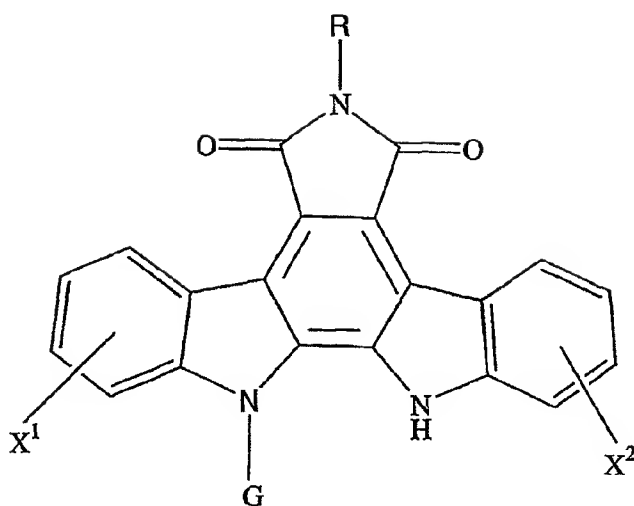
8. 請求の範囲4または5に記載のポリヌクレオチドを含有することを特徴とする組換えベクター。

9. 請求の範囲8に記載の組換えベクターを保持する形質転換体。

10. 請求の範囲9に記載の形質転換体を培養し、該形質転換体またはその培養上清から発現させたタンパク質または部分ペプチドを回収する工程を含む、請求の範囲1から3のいずれかに記載のタンパク質または部分ペプチドの製造方法。

11. 請求の範囲1から3のいずれかに記載のタンパク質または部分ペプチドに特異的に結合する抗体。

12. 下記一般式（I）で表される化合物に対して耐性を有する哺乳動物細胞を検出するために用いる、請求の範囲11記載の抗体。



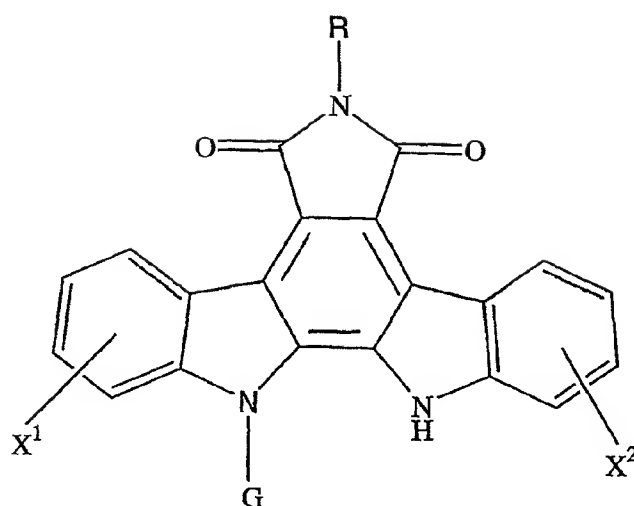
(I)

式中、 X^1 および X^2 はそれぞれ独立に水素原子、ハロゲン原子、又はヒドロキシ基を示し、 R は水素原子、アミノ基、ホルミルアミノ基、又は1ないし3個のヒドロキシ基、置換基を有していてもよいピリジル基および置換基を有していてもよいチエニル基からなる群から選ばれる置換基によって置換されてもよい低級アルキルアミノ基であり、 G は五炭糖基、六炭糖基、又はアミノ基によって置換を有されてもよい五炭糖基若しくは六炭糖基を示す。

13. 請求の範囲1または2記載のタンパク質の発現を抑制するアンチセンスヌクレオチド。

14. 請求の範囲1または2記載のタンパク質の発現を指標とすることにより癌患者の癌化学療法剤に対する耐性を予測する方法。

15. 前記癌化学療法剤が、下記一般式(I)で表される化合物であることを特徴とする請求の範囲14記載の方法。



(I)

式中、 X^1 および X^2 はそれぞれ独立に水素原子、ハロゲン原子、又はヒドロキシ基を示し、 R は水素原子、アミノ基、ホルミルアミノ基、又は1ないし3個のヒドロキシ基、置換基を有していてもよいピリジル基および置換基を有していてもよいチエニル基からなる群から選ばれる置換基によって置換されてもよい低級アルキルアミノ基であり、 G は五炭糖基、六炭糖基、又はアミノ基によって置換を有されてもよい五炭糖基若しくは六炭糖基を示す。

16. 請求の範囲1または2記載のタンパク質の機能を阻害する物質をスクリーニングする方法であって、

(a) 前記タンパク質と、癌化学療法剤と、候補化合物とを接触させる工程、及び

(b) 前記タンパク質の活性を抑制する候補化合物を選択する工程、を含むことを特徴とする阻害剤のスクリーニング方法。

17. 前記タンパク質の活性が、前記癌化学療法剤を基質として、該基質との結合活性、該基質結合時のATP分解活性、または該基質の膜輸送活性である請求の範囲16に記載のスクリーニング方法。

18. 請求の範囲1または2記載のタンパク質の機能を阻害する物質をスクリー

ーニングする方法であって、

(a) 請求の範囲 1 または 2 に記載のタンパク質を発現する哺乳動物細胞に、癌化学療法剤、及び候補化合物を接触させる工程、及び

(b) 前記癌化学療法剤が有する前記哺乳動物細胞に対する毒性を増強する候補化合物を選択する工程、

を含むことを特徴とする阻害剤のスクリーニング方法。

19. 請求の範囲 16 から 18 のいずれかに記載の方法によって得られる阻害剤。

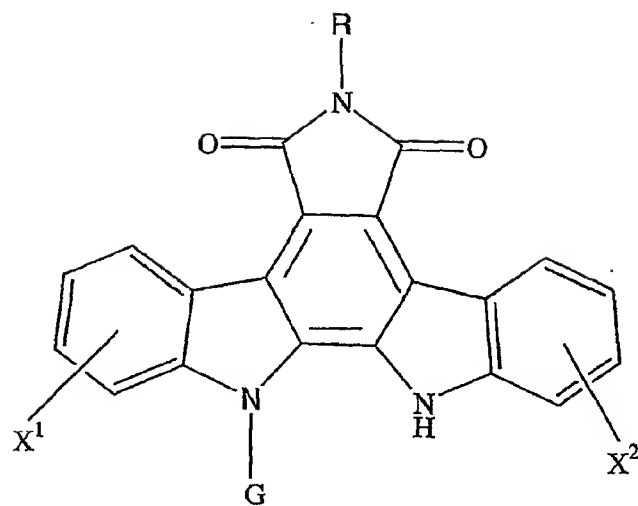
20. 請求の範囲 19 に記載の阻害剤により、請求の範囲 1 に記載のタンパク質の機能を阻害する方法。

21. 請求の範囲 11 または 12 に記載の抗体により、請求の範囲 1 に記載のタンパク質の機能を阻害する方法。

22. 請求の範囲 13 に記載のアンチセンスヌクレオチドにより、請求の範囲 1 に記載のタンパク質の発現を阻害する方法。

23. 請求の範囲 20 から 22 のいずれかに記載の方法により請求の範囲 1 に記載のタンパク質の機能または発現を阻害することを特徴とする、癌患者の化学療法剤に対する感受性を高める方法。

24. 前記癌化学療法剤が、下記一般式 (I) で表される化合物であることを特徴とする請求の範囲 23 に記載の方法。



(I)

式中、X¹およびX²はそれぞれ独立に水素原子、ハロゲン原子、又はヒドロキシ基を示し、Rは水素原子、アミノ基、ホルミルアミノ基、又は1ないし3個のヒドロキシ基、置換基を有していてもよいピリジル基および置換基を有していてもよいチエニル基からなる群から選ばれる置換基によって置換されてもよい低級アルキルアミノ基であり、Gは五炭糖基、六炭糖基、又はアミノ基によって置換を有されてもよい五炭糖基若しくは六炭糖基を示す。

図 1

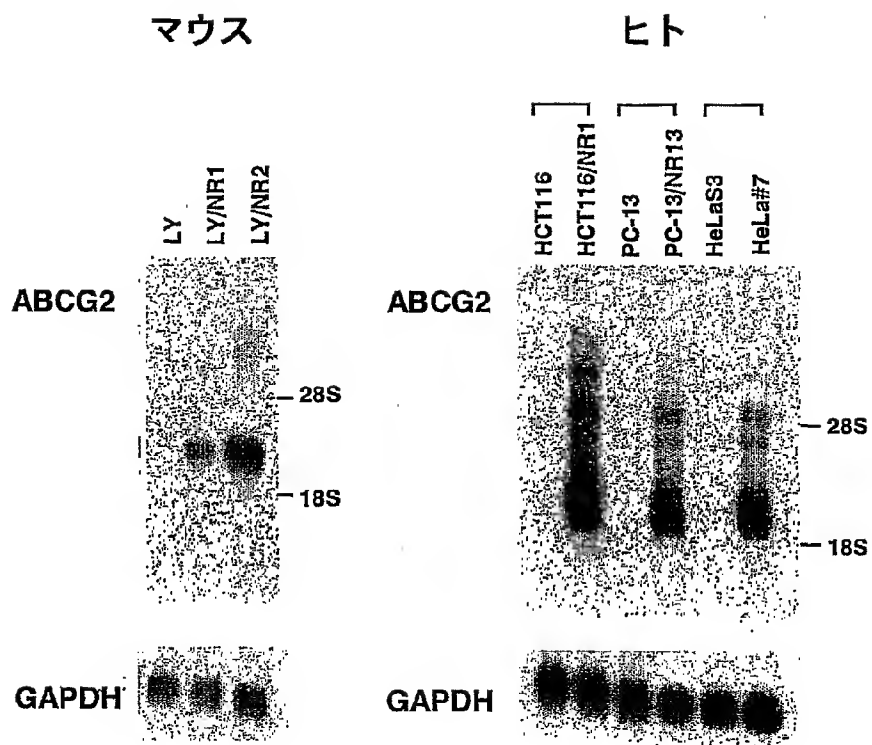


図 2

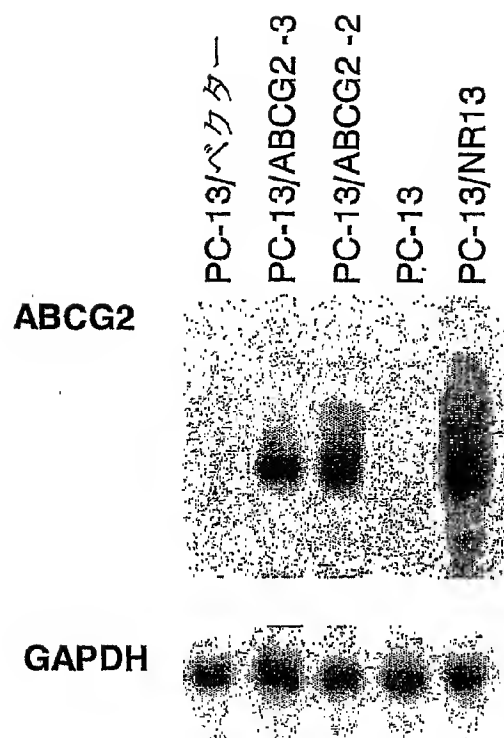


図 3

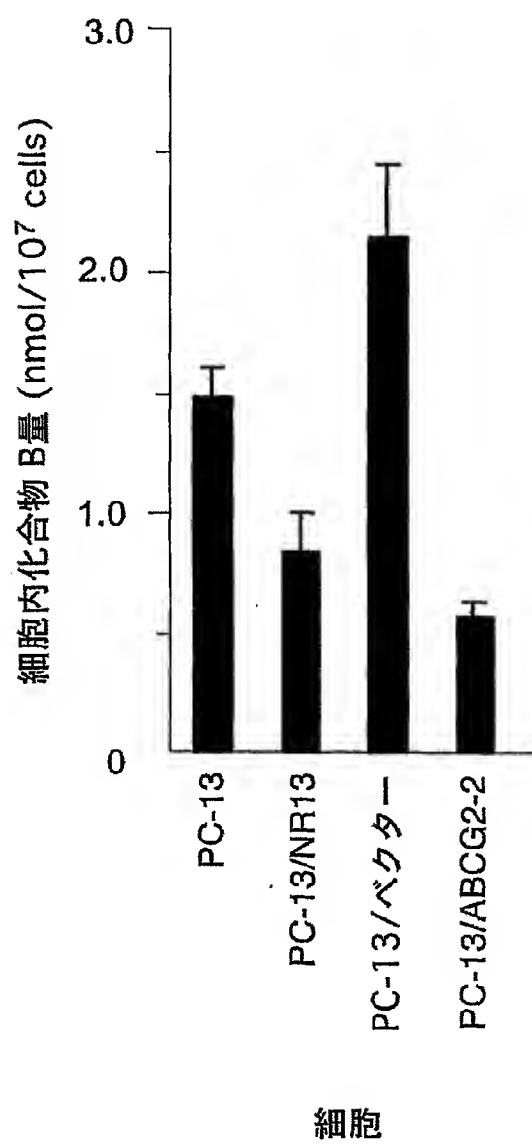
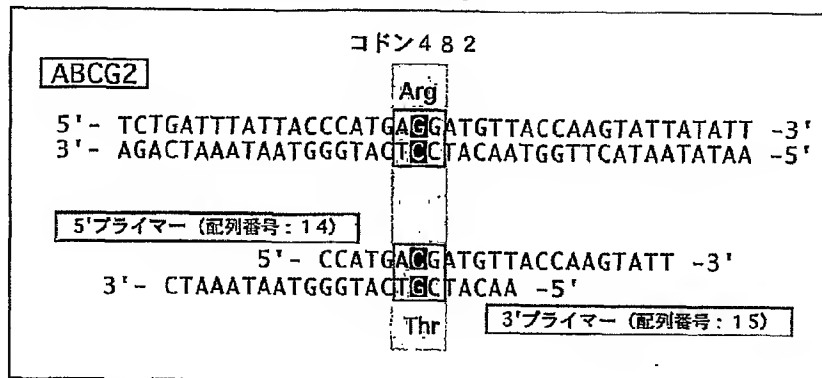


図 4

(a) 塩基置換部位のプライマー設計



(b) 2段階PCR

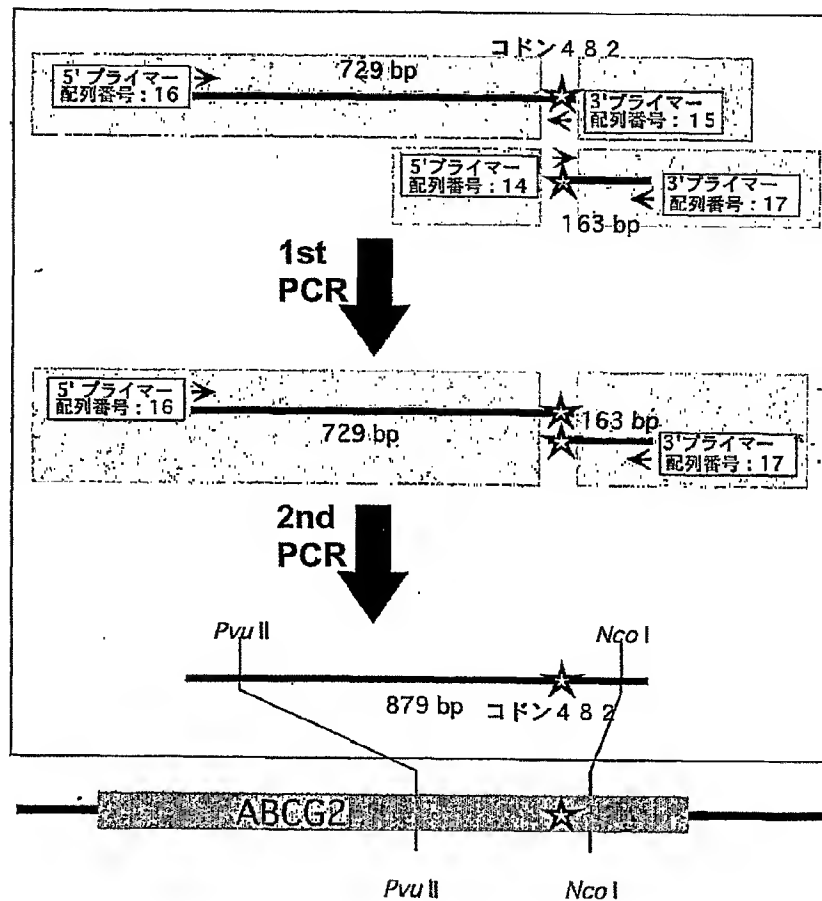


図 5

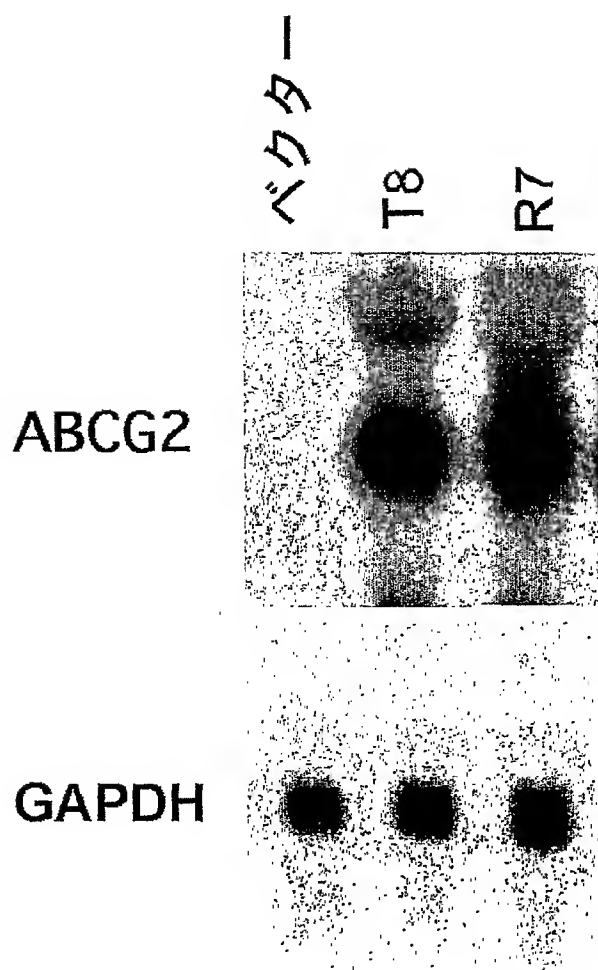


図 6

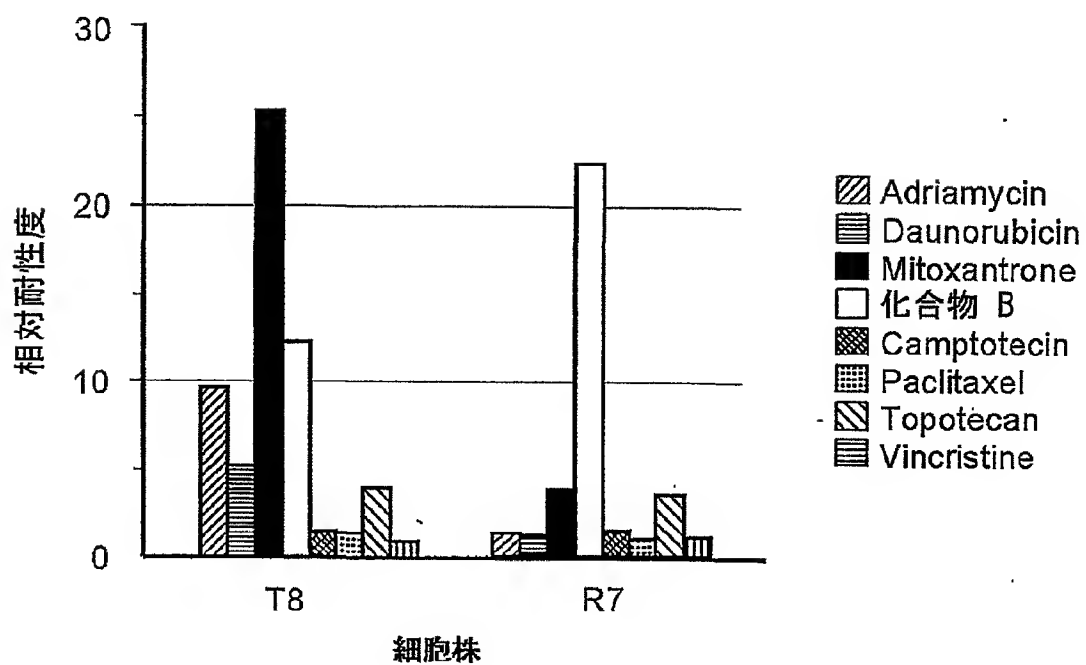
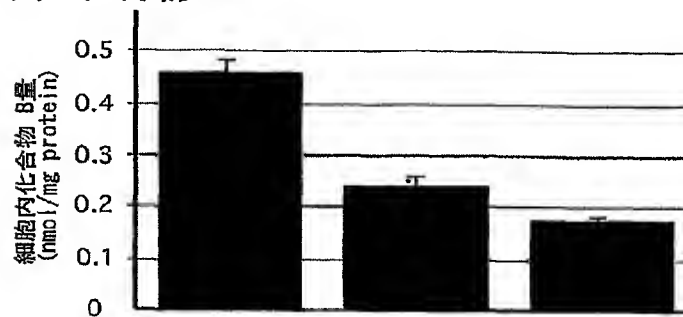
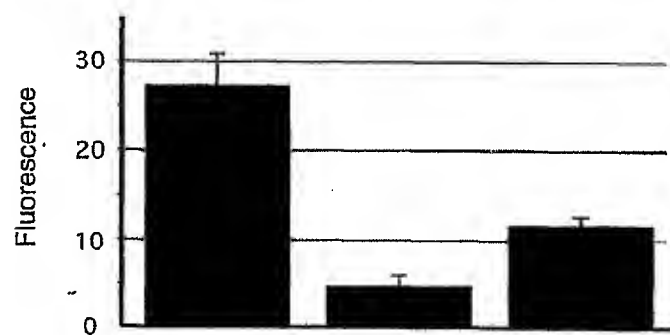


図 7

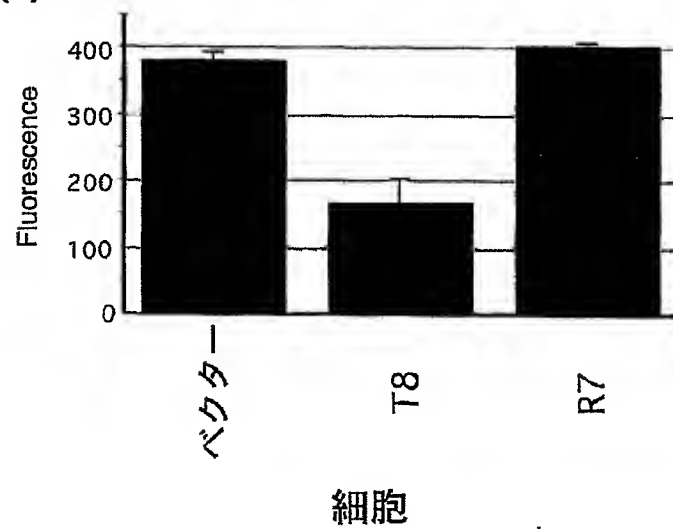
(a) 化合物 B



(b) Mitoxantrone



(c) Rhodamine 123



「配列表」

SEQUENCE LISTING

<110> BANYU PHARMACEUTICAL CO., LTD

<120> Drug resistance gene and use thereof

<130> P2678PCT-GN

<140>

<141>

<150> JP P2000-303441

<151> 2000-10-03

<160> 17

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 2027

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (45).. (2009)

<223> human ABCG2

<400> 1

ttaagaccga gctctattaa gctgaaaaga taaaaactct ccag atg tct tcc agt 56

Met Ser Ser Ser

1

aat gtc gaa gtt ttt atc cca gtg tca caa gga aac acc aat ggc ttc 104

Asn Val Glu Val Phe Ile Pro Val Ser Gln Gly Asn Thr Asn Gly Phe

5

10

15

20

ccc gcg aca gct tcc aat gac ctg aag gca ttt act gaa gga gct gtg 152

Pro Ala Thr Ala Ser Asn Asp Leu Lys Ala Phe Thr Glu Gly Ala Val

25

30

35

tta agt ttt cat aac atc tgc tat cga gta aaa ctg aag agt ggc ttt 200

Leu Ser Phe His Asn Ile Cys Tyr Arg Val Lys Leu Lys Ser Gly Phe

40

45

50

cta cct tgt cga aaa cca gtt gag aaa gaa ata tta tcg aat atc aat 248

Leu Pro Cys Arg Lys Pro Val Glu Lys Glu Ile Leu Ser Asn Ile Asn

55

60

65

ggg atc atg aaa cct ggt ctc aac gcc atc ctg gga ccc aca ggt gga 296

Gly Ile Met Lys Pro Gly Leu Asn Ala Ile Leu Gly Pro Thr Gly Gly

70

75

80

ggc aaa tct tcg tta tta gat gtc tta gct gca agg aaa gat cca agt 344

Gly Lys Ser Ser Leu Leu Asp Val Leu Ala Ala Arg Lys Asp Pro Ser

85	90	95	100	
gga tta tct gga gat gtt ctg ata aat gga gca ccg cga cct gcc aat				392
Gly Leu Ser Gly Asp Val Leu Ile Asn Gly Ala Pro Arg Pro Ala Asn				
	105	110	115	
ttc aaa tgt aat tca ggt tac gtg gta caa gat gat gtt gtg atg ggc				440
Phe Lys Cys Asn Ser Gly Tyr Val Val Gln Asp Asp Val Val Met Gly				
	120	125	130	
act ctg acg gtg aga gaa aac tta cag ttc tca gca gct ctt cgg ctt				488
Thr Leu Thr Val Arg Glu Asn Leu Gln Phe Ser Ala Ala Leu Arg Leu				
	135	140	145	
gca aca act atg acg aat cat gaa aaa aac gaa cgg att aac agg gtc				536
Ala Thr Thr Met Thr Asn His Glu Lys Asn Glu Arg Ile Asn Arg Val				
	150	155	160	
att caa gag tta ggt ctg gat aaa gtg gca gac tcc aag gtt gga act				584
Ile Gln Glu Leu Gly Leu Asp Lys Val Ala Asp Ser Lys Val Gly Thr				
165	170	175	180	
cag ttt atc cgt ggt gtg tct gga gga gaa aga aaa agg act agt ata				632
Gln Phe Ile Arg Gly Val Ser Gly Gly Glu Arg Lys Arg Thr Ser Ile				
	185	190	195	
gga atg gag ctt atc act gat cct tcc atc ttg ttc ttg gat gag cct				680
Gly Met Glu Leu Ile Thr Asp Pro Ser Ile Leu Phe Leu Asp Glu Pro				

200	205	210	
aca act ggc tta gac tca agc aca gca aat gct gtc ctt ttg ctc ctg			728
Thr Thr Gly Leu Asp Ser Ser Thr Ala Asn Ala Val Leu Leu Leu Leu			
215	220	225	
aaa agg atg tct aag cag gga cga aca atc atc ttc tcc att cat cag			776
Lys Arg Met Ser Lys Gln Gly Arg Thr Ile Ile Phe Ser Ile His Gln			
230	235	240	
cct cga tat tcc atc ttc aag ttg ttt gat agc ctc acc tta ttg gcc			824
Pro Arg Tyr Ser Ile Phe Lys Leu Phe Asp Ser Leu Thr Leu Leu Ala			
245	250	255	260
tca gga aga ctt atg ttc cac ggg cct gct cag gag gcc ttg gga tac			872
Ser Gly Arg Leu Met Phe His Gly Pro Ala Gln Glu Ala Leu Gly Tyr			
265	270	275	
ttt gaa tca gct ggt tat cac tgt gag gcc tat aat aac cct gca gac			920
Phe Glu Ser Ala Gly Tyr His Cys Glu Ala Tyr Asn Asn Pro Ala Asp			
280	285	290	
ttc ttc ttg gac atc att aat gga gat tcc act gct gtg gca tta aac			968
Phe Phe Leu Asp Ile Ile Asn Gly Asp Ser Thr Ala Val Ala Leu Asn			
295	300	305	
aga gaa gaa gac ttt aaa gcc aca gag atc ata gag cct tcc aag cag			1016
Arg Glu Glu Asp Phe Lys Ala Thr Glu Ile Ile Glu Pro Ser Lys Gln			

310	315	320	
gat aag cca ctc ata gaa aaa tta gcg gag att tat gtc aac tcc tcc 1064			
Asp Lys Pro Leu Ile Glu Lys Leu Ala Glu Ile Tyr Val Asn Ser Ser			
325	330	335	340
ttc tac aaa gag aca aaa gct gaa tta cat caa ctt tcc ggg ggt gag 1112			
Phe Tyr Lys Glu Thr Lys Ala Glu Leu His Gln Leu Ser Gly Gly Glu			
	345	350	355
aag aag aag aag atc aca gtc ttc aag gag atc agc tac acc acc tcc 1160			
Lys Lys Lys Lys Ile Thr Val Phe Lys Glu Ile Ser Tyr Thr Thr Ser			
	360	365	370
ttc tgt cat caa ctc aga tgg gtt tcc aag cgt tca ttc aaa aac ttg 1208			
Phe Cys His Gln Leu Arg Trp Val Ser Lys Arg Ser Phe Lys Asn Leu			
	375	380	385
ctg ggt aat ccc cag gcc tct ata gct cag atc att gtc aca gtc gta 1256			
Leu Gly Asn Pro Gln Ala Ser Ile Ala Gln Ile Ile Val Thr Val Val			
390	395	400	
ctg gga ctg gtt ata ggt gcc att tac ttt ggg cta aaa aat gat tct 1304			
Leu Gly Leu Val Ile Gly Ala Ile Tyr Phe Gly Leu Lys Asn Asp Ser			
405	410	415	420
act gga atc cag aac aga gct ggg gtt ctc ttc ttc ctg acg acc aac 1352			
Thr Gly Ile Gln Asn Arg Ala Gly Val Leu Phe Phe Leu Thr Thr Asn			

425	430	435	
cag tgt ttc agc agt gtt tca gcc gtg gaa ctc ttt gtg gta gag aag			1400
Gln Cys Phe Ser Ser Val Ser Ala Val Glu Leu Phe Val Val Glu Lys			
440	445	450	
aag ctc ttc ata cat gaa tac atc agc gga tac tac aga gtg tca tct			1448
Lys Leu Phe Ile His Glu Tyr Ile Ser Gly Tyr Tyr Arg Val Ser Ser			
455	460	465	
tat ttc ctt gga aaa ctg tta tct gat tta tta ccc atg agg atg tta			1496
Tyr Phe Leu Gly Lys Leu Leu Ser Asp Leu Leu Pro Met Arg Met Leu			
470	475	480	
cca agt att ata ttt acc tgt ata gtg tac ttc atg tta gga ttg aag			1544
Pro Ser Ile Ile Phe Thr Cys Ile Val Tyr Phe Met Leu Gly Leu Lys			
485	490	495	500
cca aag gca gat gcc ttc ttc gtt atg atg ttt acc ctt atg atg gtg			1592
Pro Lys Ala Asp Ala Phe Phe Val Met Met Phe Thr Leu Met Met Val			
505	510	515	
gct tat tca gcc agt tcc atg gca ctg gcc ata gca gca ggt cag agt			1640
Ala Tyr Ser Ala Ser Ser Met Ala Leu Ala Ile Ala Ala Gly Gln Ser			
520	525	530	
gtg gtt tct gta gca aca ctt ctc atg acc atc tgt ttt gtg ttt atg			1688
Val Val Ser Val Ala Thr Leu Leu Met Thr Ile Cys Phe Val Phe Met			

535	540	545	
atg att ttt tca ggt ctg ttg gtc aat ctc aca acc att gca tct tgg			1736
Met Ile Phe Ser Gly Leu Leu Val Asn Leu Thr Thr Ile Ala Ser Trp			
550	555	560	
ctg tca tgg ctt cag tac ttc agc att cca cga tat gga ttt acg gct			1784
Leu Ser Trp Leu Gln Tyr Phe Ser Ile Pro Arg Tyr Gly Phe Thr Ala			
565	570	575	580
ttg cag cat aat gaa ttt ttg gga caa aac ttc tgc cca gga ctc aat			1832
Leu Gln His Asn Glu Phe Leu Gly Gln Asn Phe Cys Pro Gly Leu Asn			
	585	590	595
gca aca gga aac aat cct tgt aac tat gca aca tgt act ggc gaa gaa			1880
Ala Thr Gly Asn Asn Pro Cys Asn Tyr Ala Thr Cys Thr Gly Glu Glu			
600	605	610	
tat ttg gta aag cag ggc atc gat ctc tca ccc tgg ggc ttg tgg aag			1928
Tyr Leu Val Lys Gln Gly Ile Asp Leu Ser Pro Trp Gly Leu Trp Lys			
615	620	625	
aat cac gtg gcc ttg gct tgt atg att gtt att ttc ctc aca att gcc			1976
Asn His Val Ala Leu Ala Cys Met Ile Val Ile Phe Leu Thr Ile Ala			
630	635	640	
tac ctg aaa ttg tta ttt ctt aaa aaa tat tct taaatttccc cttaattc			2027
Tyr Leu Lys Leu Leu Phe Leu Lys Lys Tyr Ser			

645

650

655

<210> 2

<211> 655

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Ser Ser Ser Asn Val Glu Val Phe Ile Pro Val Ser Gln Gly Asn

1

5

10

15

Thr Asn Gly Phe Pro Ala Thr Ala Ser Asn Asp Leu Lys Ala Phe Thr

20

25

30

Glu Gly Ala Val Leu Ser Phe His Asn Ile Cys Tyr Arg Val Lys Leu

35

40

45

Lys Ser Gly Phe Leu Pro Cys Arg Lys Pro Val Glu Lys Glu Ile Leu

50

55

60

Ser Asn Ile Asn Gly Ile Met Lys Pro Gly Leu Asn Ala Ile Leu Gly

65

70

75

80

Pro Thr Gly Gly Gly Lys Ser Ser Leu Leu Asp Val Leu Ala Ala Arg

85

90

95

Lys Asp Pro Ser Gly Leu Ser Gly Asp Val Leu Ile Asn Gly Ala Pro

100	105	110
Arg Pro Ala Asn Phe Lys Cys Asn Ser Gly Tyr Val Val Gln Asp Asp		
115	120	125
Val Val Met Gly Thr Leu Thr Val Arg Glu Asn Leu Gln Phe Ser Ala		
130	135	140
Ala Leu Arg Leu Ala Thr Thr Met Thr Asn His Glu Lys Asn Glu Arg		
145	150	155
160		
Ile Asn Arg Val Ile Gln Glu Leu Gly Leu Asp Lys Val Ala Asp Ser		
165	170	175
Lys Val Gly Thr Gln Phe Ile Arg Gly Val Ser Gly Gly Glu Arg Lys		
180	185	190
Arg Thr Ser Ile Gly Met Glu Leu Ile Thr Asp Pro Ser Ile Leu Phe		
195	200	205
Leu Asp Glu Pro Thr Thr Gly Leu Asp Ser Ser Thr Ala Asn Ala Val		
210	215	220
Leu Leu Leu Leu Lys Arg Met Ser Lys Gln Gly Arg Thr Ile Ile Phe		
225	230	235
240		
Ser Ile His Gln Pro Arg Tyr Ser Ile Phe Lys Leu Phe Asp Ser Leu		
245	250	255

Thr Leu Leu Ala Ser Gly Arg Leu Met Phe His Gly Pro Ala Gln Glu

260

265

270

Ala Leu Gly Tyr Phe Glu Ser Ala Gly Tyr His Cys Glu Ala Tyr Asn

275

280

285

Asn Pro Ala Asp Phe Phe Leu Asp Ile Ile Asn Gly Asp Ser Thr Ala

290

295

300

Val Ala Leu Asn Arg Glu Glu Asp Phe Lys Ala Thr Glu Ile Ile Glu

305

310

315

320

Pro Ser Lys Gln Asp Lys Pro Leu Ile Glu Lys Leu Ala Glu Ile Tyr

325

330

335

Val Asn Ser Ser Phe Tyr Lys Glu Thr Lys Ala Glu Leu His Gln Leu

340

345

350

Ser Gly Gly Glu Lys Lys Lys Lys Ile Thr Val Phe Lys Glu Ile Ser

355

360

365

Tyr Thr Thr Ser Phe Cys His Gln Leu Arg Trp Val Ser Lys Arg Ser

370

375

380

Phe Lys Asn Leu Leu Gly Asn Pro Gln Ala Ser Ile Ala Gln Ile Ile

385

390

395

400

Val Thr Val Val Leu Gly Leu Val Ile Gly Ala Ile Tyr Phe Gly Leu

405

410

415

Lys Asn Asp Ser Thr Gly Ile Gln Asn Arg Ala Gly Val Leu Phe Phe

420

425

430

Leu Thr Thr Asn Gln Cys Phe Ser Ser Val Ser Ala Val Glu Leu Phe

435

440

445

Val Val Glu Lys Lys Leu Phe Ile His Glu Tyr Ile Ser Gly Tyr Tyr

450

455

460

Arg Val Ser Ser Tyr Phe Leu Gly Lys Leu Leu Ser Asp Leu Leu Pro

465

470

475

480

Met Arg Met Leu Pro Ser Ile Ile Phe Thr Cys Ile Val Tyr Phe Met

485

490

495

Leu Gly Leu Lys Pro Lys Ala Asp Ala Phe Phe Val Met Met Phe Thr

500

505

510

Leu Met Met Val Ala Tyr Ser Ala Ser Ser Met Ala Leu Ala Ile Ala

515

520

525

Ala Gly Gln Ser Val Val Ser Val Ala Thr Leu Leu Met Thr Ile Cys

530

535

540

Phe Val Phe Met Met Ile Phe Ser Gly Leu Leu Val Asn Leu Thr Thr

545 550 555 560

Ile Ala Ser Trp Leu Ser Trp Leu Gln Tyr Phe Ser Ile Pro Arg Tyr

565 570 575

Gly Phe Thr Ala Leu Gln His Asn Glu Phe Leu Gly Gln Asn Phe Cys

580 585 590

Pro Gly Leu Asn Ala Thr Gly Asn Asn Pro Cys Asn Tyr Ala Thr Cys

595 600 605

Thr Gly Glu Glu Tyr Leu Val Lys Gln Gly Ile Asp Leu Ser Pro Trp

610 615 620

Gly Leu Trp Lys Asn His Val Ala Leu Ala Cys Met Ile Val Ile Phe

625 630 635 640

Leu Thr Ile Ala Tyr Leu Lys Leu Leu Phe Leu Lys Lys Tyr Ser

645 650 655

<210> 3

<211> 63

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:artificially
synthesized primer sequence

<400> 3

ggccagtgaa ttgtaatacg actcactata gggaggcggg tttttttttt tttttttttt 60
ttt 63

<210> 4

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:artificially
synthesized primer sequence

<400> 4

ctcatitaaa aacttgctcg ggaacc 26

<210> 5

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially

synthesized primer sequence

<400> 5

caagaggcca gaaaagagca tcataa

26

<210> 6

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized primer sequence

<400> 6

tactggggct tattattggt g

21

<210> 7

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:artificially
synthesized primer sequence

<400> 7

aaaagcgatt gtcatgagaa gtgt

24

<210> 8

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:artificially
synthesized primer sequence

<400> 8

caaaaagctt aagaccgagc tciattaagc

30

<210> 9

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:artificially
synthesized primer sequence

<400> 9

atcctctaga ccaggtttca tgatccatt g

31

<210> 10

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:artificially
synthesized primer sequence

<400> 10

gaattaagg gaaatttaag aat

23

<210> 11

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:artificially
synthesized primer sequence

<400> 11

agagatcgat gccctgcttt acca

24

<210> 12

<211> 2053

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:ABCG2-482T

<220>

<221> CDS

<222> (32).. (1999)

<400> 12

```

ctattaagct gaaaagataa aaactctcca g atg tet tcc agt aat gtc gaa    52
                               Met Ser Ser Ser Asn Val Glu
                               1             5

```

```

gtt ttt atc cca gtg tca caa gga aac acc aat ggc ttc ccc gcg aca    100
Val Phe Ile Pro Val Ser Gln Gly Asn Thr Asn Gly Phe Pro Ala Thr
      10             15             20

```

```

gct tcc aat gac ctg aag gca ttt act gaa gga gct gtg tta agt ttt    148
Ala Ser Asn Asp Leu Lys Ala Phe Thr Glu Gly Ala Val Leu Ser Phe
      25             30             35

```

```

cat aac atc tgc tat cga gta aaa ctg aag agt ggc ttt cta cct tgt    196
His Asn Ile Cys Tyr Arg Val Lys Leu Lys Ser Gly Phe Leu Pro Cys
      40             45             50             55

```

cga aaa cca gtt gag aaa gaa ata tta tcg aat atc aat ggg atc atg 244

Arg Lys Pro Val Glu Lys Glu Ile Leu Ser Asn Ile Asn Gly Ile Met

60

65

70

aaa cct ggt ctc aac gcc atc ctg gga ccc aca ggt gga ggc aaa tct 292

Lys Pro Gly Leu Asn Ala Ile Leu Gly Pro Thr Gly Gly Gly Lys Ser

75

80

85

tcg tta tta gat gtc tta gct gca agg aaa gat cca agt gga tta tct 340

Ser Leu Leu Asp Val Leu Ala Ala Arg Lys Asp Pro Ser Gly Leu Ser

90

95

100

gga gat gtt ctg ata aat gga gca ccg cga cct gcc aat ttc aaa tgt 388

Gly Asp Val Leu Ile Asn Gly Ala Pro Arg Pro Ala Asn Phe Lys Cys

105

110

115

aat tca ggt tac gtg gta caa gat gat gtt gtg atg ggc act ctg acg 436

Asn Ser Gly Tyr Val Val Gln Asp Asp Val Val Met Gly Thr Leu Thr

120

125

130

135

gtg aga gaa aac tta cag ttc tca gca gct ctt cgg ctt gca aca act 484

Val Arg Glu Asn Leu Gln Phe Ser Ala Ala Leu Arg Leu Ala Thr Thr

140

145

150

atg acg aat cat gaa aaa aac gaa cgg att aac agg gtc att caa gag 532

Met Thr Asn His Glu Lys Asn Glu Arg Ile Asn Arg Val Ile Gln Glu

155

160

165

tta ggt ctg gat aaa gtg gca gac tcc aag gtt gga act cag ttt atc 580
 Leu Gly Leu Asp Lys Val Ala Asp Ser Lys Val Gly Thr Gln Phe Ile
 170 175 180

cgt ggt gtg tct gga gga gaa aga aaa agg act agt ata gga atg gag 628
 Arg Gly Val Ser Gly Gly Glu Arg Lys Arg Thr Ser Ile Gly Met Glu
 185 190 195

ctt atc act gat cct tcc atc ttg ttc ttg gat gag cct aca act ggc 676
 Leu Ile Thr Asp Pro Ser Ile Leu Phe Leu Asp Glu Pro Thr Thr Gly
 200 205 210 215

tta gac tca agc aca gca aat gct gtc ctt ttg ctc ctg aaa agg atg 724
 Leu Asp Ser Ser Thr Ala Asn Ala Val Leu Leu Leu Leu Lys Arg Met
 220 225 230

tct aag cag gga cga aca atc atc ttc tcc att cat cag cct cga tat 772
 Ser Lys Gln Gly Arg Thr Ile Ile Phe Ser Ile His Gln Pro Arg Tyr
 235 240 245

tcc atc ttc aag ttg ttt gat agc ctc acc tta ttg gcc tca gga aga 820
 Ser Ile Phe Lys Leu Phe Asp Ser Leu Thr Leu Leu Ala Ser Gly Arg
 250 255 260

ctt atg ttc cac ggg cct gct cag gag gcc ttg gga tac ttt gaa tca 868
 Leu Met Phe His Gly Pro Ala Gln Glu Ala Leu Gly Tyr Phe Glu Ser
 265 270 275

gct ggt tat cac tgt gag gcc tat aat aac cct gca gac ttc ttc ttg 916
 Ala Gly Tyr His Cys Glu Ala Tyr Asn Asn Pro Ala Asp Phe Phe Leu
 280 285 290 295

gac atc att aat gga gat tcc act gct gtg gca tta aac aga gaa gaa 964
 Asp Ile Ile Asn Gly Asp Ser Thr Ala Val Ala Leu Asn Arg Glu Glu
 300 305 310

gac ttt aaa gcc aca gag atc ata gag cct tcc aag cag gat aag cca 1012
 Asp Phe Lys Ala Thr Glu Ile Ile Glu Pro Ser Lys Gln Asp Lys Pro
 315 320 325

ctc ata gaa aaa tta gcg gag att tat gtc aac tcc tcc ttc tac aaa 1060
 Leu Ile Glu Lys Leu Ala Glu Ile Tyr Val Asn Ser Ser Phe Tyr Lys
 330 335 340

gag aca aaa gct gaa tta cat caa ctt tcc ggg ggt gag aag aag aag 1108
 Glu Thr Lys Ala Glu Leu His Gln Leu Ser Gly Gly Glu Lys Lys Lys
 345 350 355

aag atc aca gtc ttc aag gag atc agc tac acc acc tcc ttc tgt cat 1156
 Lys Ile Thr Val Phe Lys Glu Ile Ser Tyr Thr Thr Ser Phe Cys His
 360 365 370 375

caa ctc aga tgg gtt tcc aag cgt tca ttc aaa aac ttg ctg ggt aat 1204
 Gln Leu Arg Trp Val Ser Lys Arg Ser Phe Lys Asn Leu Leu Gly Asn
 380 385 390

ccc cag gcc tct ata gct cag atc att gtc aca gtc gta ctg gga ctg 1252
 Pro Gln Ala Ser Ile Ala Gln Ile Ile Val Thr Val Val Leu Gly Leu
 395 400 405

gtt ata ggt gcc att tac ttt ggg cta aaa aat gat tct act gga atc 1300
 Val Ile Gly Ala Ile Tyr Phe Gly Leu Lys Asn Asp Ser Thr Gly Ile
 410 415 420

cag aac aga gct ggg gtt ctc ttc ttc ctg acg acc aac cag tgt ttc 1348
 Gln Asn Arg Ala Gly Val Leu Phe Phe Leu Thr Thr Asn Gln Cys Phe
 425 430 435

agc agt gtt tca gcc gtg gaa ctc ttt gtg gta gag aag aag ctc ttc 1396
 Ser Ser Val Ser Ala Val Glu Leu Phe Val Val Glu Lys Lys Leu Phe
 440 445 450 455

ata cat gaa tac atc agc gga tac tac aga gtg tca tct tat ttc ctt 1444
 Ile His Glu Tyr Ile Ser Gly Tyr Tyr Arg Val Ser Ser Tyr Phe Leu
 460 465 470

gga aaa ctg tta tct gat tta tta ccc atg acg atg tta cca agt att 1492
 Gly Lys Leu Leu Ser Asp Leu Leu Pro Met Thr Met Leu Pro Ser Ile
 475 480 485

ata ttt acc tgt ata gtg tac ttc atg tta gga ttg aag cca aag gca 1540
 Ile Phe Thr Cys Ile Val Tyr Phe Met Leu Gly Leu Lys Pro Lys Ala
 490 495 500

gat gcc ttc ttc gtt atg atg ttt acc ctt atg atg gtg gct tat tca 1588

Asp Ala Phe Phe Val Met Met Phe Thr Leu Met Met Val Ala Tyr Ser

505

510

515

gcc agt tcc atg gca ctg gcc ata gca gca ggt cag agt gtg gtt tct 1636

Ala Ser Ser Met Ala Leu Ala Ile Ala Ala Gly Gln Ser Val Val Ser

520

525

530

535

gta gca aca ctt ctc atg acc atc tgt ttt gtg ttt atg atg att ttt 1684

Val Ala Thr Leu Leu Met Thr Ile Cys Phe Val Phe Met Met Ile Phe

540

545

550

tca ggt ctg ttg gtc aat ctc aca acc att gca tct tgg ctg tca tgg 1732

Ser Gly Leu Leu Val Asn Leu Thr Thr Ile Ala Ser Trp Leu Ser Trp

555

560

565

ctt cag tac ttc agc att cca cga tat gga ttt acg gct ttg cag cat 1780

Leu Gln Tyr Phe Ser Ile Pro Arg Tyr Gly Phe Thr Ala Leu Gln His

570

575

580

aat gaa ttt ttg gga caa aac ttc tgc cca gga ctc aat gca aca gga 1828

Asn Glu Phe Leu Gly Gln Asn Phe Cys Pro Gly Leu Asn Ala Thr Gly

585

590

595

aac aat cct tgt aac tat gca aca tgt act ggc gaa gaa tat ttg gta 1876

Asn Asn Pro Cys Asn Tyr Ala Thr Cys Thr Gly Glu Glu Tyr Leu Val

600

605

610

615

aag cag ggc atc gat ctc tca ccc tgg ggc ttg tgg aag aat cac gtg 1924

Lys Gln Gly Ile Asp Leu Ser Pro Trp Gly Leu Trp Lys Asn His Val

620

625

630

gcc ttg gct tgt atg att gtt att ttc ctc aca att gcc tac ctg aaa 1972

Ala Leu Ala Cys Met Ile Val Ile Phe Leu Thr Ile Ala Tyr Leu Lys

635

640

645

ttg tta ttt ctt aaa aaa tat tct taa atttcccctt aattcaaggg 2019

Leu Leu Phe Leu Lys Lys Tyr Ser

650

655

caattctgca gatatccagc acagtggcgg ccgc 2053

<210> 13

<211> 655

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<223> Description of Artificial Sequence:ABCG2-482T

<400> 13

Met Ser Ser Ser Asn Val Glu Val Phe Ile Pro Val Ser Gln Gly Asn

1

5

10

15

Thr Asn Gly Phe Pro Ala Thr Ala Ser Asn Asp Leu Lys Ala Phe Thr

20

25

30

Glu Gly Ala Val Leu Ser Phe His Asn Ile Cys Tyr Arg Val Lys Leu

35	40	45
Lys Ser Gly Phe Leu Pro Cys Arg Lys Pro Val Glu Lys Glu Ile Leu		
50	55	60
Ser Asn Ile Asn Gly Ile Met Lys Pro Gly Leu Asn Ala Ile Leu Gly		
65	70	75
Pro Thr Gly Gly Gly Lys Ser Ser Leu Leu Asp Val Leu Ala Ala Arg		
85	90	95
Lys Asp Pro Ser Gly Leu Ser Gly Asp Val Leu Ile Asn Gly Ala Pro		
100	105	110
Arg Pro Ala Asn Phe Lys Cys Asn Ser Gly Tyr Val Val Gln Asp Asp		
115	120	125
Val Val Met Gly Thr Leu Thr Val Arg Glu Asn Leu Gln Phe Ser Ala		
130	135	140
Ala Leu Arg Leu Ala Thr Thr Met Thr Asn His Glu Lys Asn Glu Arg		
145	150	155
Ile Asn Arg Val Ile Gln Glu Leu Gly Leu Asp Lys Val Ala Asp Ser		
165	170	175
Lys Val Gly Thr Gln Phe Ile Arg Gly Val Ser Gly Gly Glu Arg Lys		
180	185	190
Arg Thr Ser Ile Gly Met Glu Leu Ile Thr Asp Pro Ser Ile Leu Phe		
195	200	205
Leu Asp Glu Pro Thr Thr Gly Leu Asp Ser Ser Thr Ala Asn Ala Val		
210	215	220
Leu Leu Leu Leu Lys Arg Met Ser Lys Gln Gly Arg Thr Ile Ile Phe		
225	230	235
Ser Ile His Gln Pro Arg Tyr Ser Ile Phe Lys Leu Phe Asp Ser Leu		
245	250	255
Thr Leu Leu Ala Ser Gly Arg Leu Met Phe His Gly Pro Ala Gln Glu		

260	265	270
Ala Leu Gly Tyr Phe Glu Ser Ala Gly Tyr His Cys Glu Ala Tyr Asn		
275	280	285
Asn Pro Ala Asp Phe Phe Leu Asp Ile Ile Asn Gly Asp Ser Thr Ala		
290	295	300
Val Ala Leu Asn Arg Glu Glu Asp Phe Lys Ala Thr Glu Ile Ile Glu		
305	310	315
Pro Ser Lys Gln Asp Lys Pro Leu Ile Glu Lys Leu Ala Glu Ile Tyr		
325	330	335
Val Asn Ser Ser Phe Tyr Lys Glu Thr Lys Ala Glu Leu His Gln Leu		
340	345	350
Ser Gly Gly Glu Lys Lys Lys Lys Ile Thr Val Phe Lys Glu Ile Ser		
355	360	365
Tyr Thr Thr Ser Phe Cys His Gln Leu Arg Trp Val Ser Lys Arg Ser		
370	375	380
Phe Lys Asn Leu Leu Gly Asn Pro Gln Ala Ser Ile Ala Gln Ile Ile		
385	390	395
Val Thr Val Val Leu Gly Leu Val Ile Gly Ala Ile Tyr Phe Gly Leu		
405	410	415
Lys Asn Asp Ser Thr Gly Ile Gln Asn Arg Ala Gly Val Leu Phe Phe		
420	425	430
Leu Thr Thr Asn Gln Cys Phe Ser Ser Val Ser Ala Val Glu Leu Phe		
435	440	445
Val Val Glu Lys Lys Leu Phe Ile His Glu Tyr Ile Ser Gly Tyr Tyr		
450	455	460
Arg Val Ser Ser Tyr Phe Leu Gly Lys Leu Leu Ser Asp Leu Leu Pro		
465	470	475
Met Thr Met Leu Pro Ser Ile Ile Phe Thr Cys Ile Val Tyr Phe Met		

	485		490		495
Leu Gly Leu Lys Pro Lys Ala Asp Ala Phe Phe Val Met Met Phe Thr					
	500		505		510
Leu Met Met Val Ala Tyr Ser Ala Ser Ser Met Ala Leu Ala Ile Ala					
	515		520		525
Ala Gly Gln Ser Val Val Ser Val Ala Thr Leu Leu Met Thr Ile Cys					
	530		535		540
Phe Val Phe Met Met Ile Phe Ser Gly Leu Leu Val Asn Leu Thr Thr					
545		550		555	560
Ile Ala Ser Trp Leu Ser Trp Leu Gln Tyr Phe Ser Ile Pro Arg Tyr					
	565		570		575
Gly Phe Thr Ala Leu Gln His Asn Glu Phe Leu Gly Gln Asn Phe Cys					
	580		585		590
Pro Gly Leu Asn Ala Thr Gly Asn Asn Pro Cys Asn Tyr Ala Thr Cys					
	595		600		605
Thr Gly Glu Glu Tyr Leu Val Lys Gln Gly Ile Asp Leu Ser Pro Trp					
	610		615		620
Gly Leu Trp Lys Asn His Val Ala Leu Ala Cys Met Ile Val Ile Phe					
625		630		635	640
Leu Thr Ile Ala Tyr Leu Lys Leu Leu Phe Leu Lys Lys Tyr Ser					
	645		650		655

<210> 14

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
synthesized primer sequence

<400> 14

ccatgacgat gttaccaagt att

23

<210> 15

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
synthesized primer sequence

<400> 15

aacatcgta tgggtaataa atc

23

<210> 16

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
synthesized primer sequence

<400> 16

cattcatcag cctcgatatt cca

23

<210> 17

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
synthesized primer sequence

<400> 17

accacactct gacctgctgc ta

22

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/08112

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C07K14/47, C12N15/09, C07K16/18, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/10, C12P21/02, C12P21/08, A61K45/00, A61K31/711, A61P43/00, A61P35/00 // (C12P21/02, C12R1:91), (C12N5/10, C12R1:91)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C07K14/47, C12N15/09, C07K16/18, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/10, C12P21/02, C12P21/08, A61K45/00, A61K31/711, A61P43/00, A61P35/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CA (STN), MEDLINE (STN), Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X P,Y	Hideya KOMATANI, et al., "Identification of Breast Cancer Resistant Protein/Mitoxantrone/Placenta-Specific, ATP-Binding Cassette Transporter as a Transporter of NB-506 and J-107088, Topoisomerase I Inhibitors with an Indolocarbazole Structure", Cancer Research, 01 April, 2001, Vol.61, pages 2827 to 2832	1-10, 11-13,16-18, 20-22
X Y	Rando ALLIKMETS, et al., "A Human Placenta-Specific ATP-Binding Cassette Gene(ABCP) on Chromosome 4q22 that is Involved in Multidrug Resistance", Cancer Research, 1 December 1998, Vol.58, p.5337-5339	1,3-5,8-11, 13,16-18,20-22 2,6,7,12
X Y A	L. Austin DOYLE, et al., "A Multidrug Resistance Transporter from Human MCF-7 Breast Cancer Cells", Proc. Natl. Acad. Sci. USA, December, 1998, Vol.95, pages 15665 to 15670	1,3-5,8-11, 13,16-18,20-22 2,6 7,12
Y	Hiroharu ARAKAWA, et al., "In vivo Anti-tumor Activity of a Novel Indolocarbazole Compound, J-107088, on Murine and Human Tumors Transplanted into Mice", Jpn. J. Cancer Res., October, 1999, Vol.90, pages 1163 to 1170	2,6,7,12

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"I" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
16 November, 2001 (16.11.01)Date of mailing of the international search report
04 December, 2001 (04.12.01)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/08112

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y A	WO 99/40110 A (University of Maryland, Baltimore), 12 August, 1999 (12.08.99), & EP 1054894 A	1,3-5,8-11,13, 16-18,20-22 2,6,12 7
X A	WO 98/55416 A (Genetics Inst. Inc.), 10 December, 1998 (10.12.98), & EP 1003855 A	1,3-5,7-11, 13,21,22 2,6,12

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/08112

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 14,15,23,24
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

The inventions as set forth in the above claims pertain to methods for treatment of the human body by therapy, as well as diagnostic methods, and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required to search.
2. ☒ Claims Nos.: 19
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

Concerning the "inhibitor" as described in the above claim, the description merely discloses a method generally employed in isolating such a substance by using the protein according to the invention. Namely, no particular inhibitor is disclosed therein. Such being the case, it is unknown what substances are involved in the scope of the "inhibitor" as described above. Thus, no meaningful search can be practiced on the above claim.
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JPO1/08112

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C07K14/47, C12N15/09, C07K16/18, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/10, C12P21/02, C12P21/08
A61K45/00, A61K31/711, A61P43/00, A61P35/00 // (C12P21/02, C12R1:91) (C12N5/10, C12R1:91)

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C07K14/47, C12N15/09, C07K16/18, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/10, C12P21/02, C12P21/08
A61K45/00, A61K31/711, A61P43/00, A61P35/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CA (STN) MEDLINE (STN) Genbank/EMBL/DBJ/GeneSeq

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
P, X P, Y	Hideya KOMATANI, et al., Identification of Breast Cancer Resistant Protein/Mitoxantrone/Placenta-Specific, ATP-binding Cassette Transporter as a Transporter of NB-506 and J-107088, Topoisomerase I Inhibitors with an Indolocarbazole Structure, CANCER RESEARCH, 1 April 2001, Vol. 61, p. 2827-2832	1-10 11-13, 16-18, 20-22

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

16. 11. 01

国際調査報告の発送日

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

光本 美奈子



4 B

9 3 5 9

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
<u>X</u> Y	Rando ALLIKMETS., et al., A Human Placenta-specific ATP-Binding Cassette Gene(ABCP) on Chromosome 4q22 That is Involved in Multidrug Resistance, CANCER RESEARCH, 1 December 1998, Vol. 58, p. 5337-5339	1, 3-5, 8-11, 13, <u>16-18, 20-22</u> 2, 6, 7, 12
<u>X</u> <u>Y</u> A	L. Austin DOYLE., et al., A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells, Proc. Natl. Acad. Sci. USA December 1998, Vol. 95, p. 15665-15670	1, 3-5, 8-11, 13, <u>16-18, 20-22</u> <u>2, 6</u> 7, 12
Y	Hiroharu ARAKAWA., et al., <i>In vivo</i> Anti-tumor Activity of a Novel Indolocarbazole Compound, J-107088, on Murine and Human Tumors Transplanted into Mice, Jpn. J. Cancer Res., October 1999 Vol. 90, p. 1163-1170	2, 6, 7, 12
<u>X</u> <u>Y</u> A	WO 9940110 A (Univ Maryland Baltimore) 12. 8月. 1999 (12. 08. 99) & EP 1054894 A	1, 3-5, 8-11, 13, <u>16-18, 20-22</u> <u>2, 6, 12</u> 7
<u>X</u> A	WO 9855416 A (Genetics Inst Inc) 10. 12月. 1998 (10. 12. 98) & EP 1003855 A	<u>1, 3-5, 7-11, 13,</u> <u>21-22</u> 2, 6, 12

法第8条第3項(PCT17条(2)(a))の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 14, 15, 23, 24 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
前記請求の範囲に記載された発明は、人の身体の治療による処置及び診断方法に係る発明であるから、国際調査を要しないものである。
2. ☒ 請求の範囲 19 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
前記請求の範囲の「阻害剤」について、明細書には、本発明の蛋白質を用いて、上記のような物質を単離する一般的な方法が記載されているのみであり、具体的な阻害剤については何ら記載されていない。してみると、上記「阻害剤」には具体的にどのような物質が含まれているのかが不明であるから、前記請求の範囲については、有意義な調査をすることができない。
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。

☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。